



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA.

**TRABAJO DE FIN DE GRADO DE
MEDICINA**

**“SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS:
APORTACIÓN DEL ANÁLISIS GENÉTICO
NGS”**

Autor: Gonzalo Castellanos Arias

Tutor: Ángel María Carracedo Álvarez

Cotutora: Celsa Quintero García

**Departamento de Ciencias Forenses, Anatomía Patológica, Ginecología y
Obstetricia y Pediatría.**

Fundación de Medicina Xenómica

Curso Académico 2019-2020

Convocatoria de Junio 2020-Primera convocatoria.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	4
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
RESUMO	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 EPIDEMIOLOGÍA	9
1.1.1 INCIDENCIA Y PREVALENCIA	10
1.1.2 FACTORES ETIOGÉNICOS	11
1.1.3 FACTORES PRONÓSTICOS	12
1.2 ETIOPATOGENIA	13
1.3 CLASIFICACIONES	14
1.3.1 CLASIFICACIÓN DE LA FAB	15
1.3.2 CLASIFICACIÓN DE LA OMS 2016	15
1.4 CITOPENIAS	17
1.5 S. MIELODISPLÁSICOS/MIELOPROLIFERATIVOS	19
1.5.1 LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA CRÓNICA	19
1.6 ABORDAJE DIAGNÓSTICO	20
1.6.1 SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN.....	21
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	22
3. METODOLOGÍA	24
4. RESULTADOS.....	27
5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	29
5.1 MUTACIONES EN SMD.....	32
5.1.1 FACTORES DE SPLICING	33
5.1.1.1 MUTACIONES EN <i>SF3B1</i>	34
5.1.1.2 MUTACIONES EN <i>ZRSR2</i>	35
5.1.1.3 MUTACIONES EN <i>SRSF2</i>	36
5.1.2 REGULADORES EPIGENÉTICOS.....	36
5.1.2.1 MUTACIONES EN <i>TET2</i>	37
5.1.2.2 MUTACIONES EN <i>DNMT3A</i>	37
5.1.3 MUTACIONES EN F. MODIFICIACIÓN DE HISTONAS	38
5.1.4 OTRAS MUTACIONES.....	38

5.2	MUTACIONES EN LMMOC	40
5.3	MUTACIONES EN CITOPENIAS/ENVEJECIMIENTO.....	40
5.4	MUTACIONES Y TRASPLANTE	42
6.	CONCLUSIONES	43

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A continuación se detallan las abreviaturas que han sido empleadas a lo largo de la elaboración de este trabajo, ordenadas de acuerdo a su orden de aparición en el texto:

- **LMA:** Leucemia Mieloide Aguda.
- **FAB:** French-American-British.
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **SMD:** Síndrome Mielodisplásico.
- **SEER:** Surveillance, Epidemiology, and End Results Program.
- **IPSS:** International Prognostic Scoring System.
- **WPSS:** WHO Classification-based Prognostic Scoring System.
- **ARNm:** ARN (ácido ribonucleico) mensajero.
- **SMD-SA:** Síndrome Mielodisplásico con Sideroblastos en Anillo.
- **MPN:** Neoplasia Mieloproliferativa.
- **SMD/MPN:** Síndrome “overlap” síndrome mielodisplásico y neoplasia mieloproliferativa.
- **LMMoC:** Leucemia Mielomonocítica Crónica.
- **Del(5q):** Delección del brazo largo del cromosoma 5.
- **Del(7q):** Delección del brazo largo del cromosoma 7.
- **SMD-DUL:** Síndrome Mielodisplásico con Displasia Unilínea.
- **SMD-DML:** Síndrome Mielodisplásico con Displasia Multilínea.
- **SMD-EB (I y II):** Síndrome Mielodisplásico con Exceso de Blastos I y II.
- **SMD-5q:** Síndrome Mielodisplásico con delección del brazo largo del cromosoma 5.
- **SMD-EB-T:** Síndrome Mielodisplásico con Exceso de Blastos en Transformación.
- **ICUS:** Citopenia Idiopática de Significado Incierto.
- **IDUS:** Displasia Idiopática de Significado Incierto.
- **CCUS:** Citopenia Clonal de Significado Incierto.
- **CHIP:** Hematopoyesis Clonal de Significado Incierto.
- **FAV:** Frecuencia Alélica de la Variante.
- **LDH:** Lactado Deshidrogenasa.
- **FISH:** Hibridación Fluorescente In Situ.
- **NGS:** Secuenciación de Nueva Generación.

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **ISCN:** The International System for Human Cytogenetic Nomenclature.
- **ARN:** Ácido ribonucleico.
- **PETHEMA:** Programa Español de Tratamientos en Hematología.
- **MAF:** Frecuencia Alélica Menor.
- **CNV:** Variaciones en el Número de Copias.
- **SA:** Sideroblastos en Anillo.
- **MGUS:** Gammopatía Monoclonal de Significado Incierto.
- **TAPH:** Trasplante Alogénico de Precursores Hematopoyéticos.

La mayoría de estas abreviaturas también han sido señaladas en el texto junto a su significado entre paréntesis la primera vez que aparecían en el mismo. El objetivo de este índice es facilitar una aclaración rápida al leer alguna de las abreviaturas a lo largo de la extensión de este trabajo.

Resumen

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) constituyen un grupo de patologías que afectan a la célula madre hematopoyética, caracterizadas por la producción ineficaz en una o más líneas celulares, morfología displásica y potencial de evolución clonal debido a la adquisición de mutaciones en diversos genes.

El uso de técnicas de citogenética en su diagnóstico ha dado paso a abordajes más innovadores aunque complementarios, como es la caracterización molecular mediante el uso de técnicas de secuenciación masiva NGS.

Hipótesis y objetivos. Este estudio pretende integrar la información que nos permite obtener el estudio de mutaciones realizado por técnicas de secuenciación masiva NGS con las técnicas citogenéticas convencionales y comprobar cuál es el significado de las alteraciones encontradas y sus posibles aplicaciones.

Metodología. Análisis de una cohorte de 15 sujetos a los que se había realizado previamente estudios de citogenética y que, posteriormente, fueron sometidos a un estudio de mutaciones mediante procedimientos de secuenciación masiva.

El panel de ADN empleado incluye los genes consenso definidos en el convenio PETHEMA y cubre la región codificante y hotspots de mutaciones en 40 genes.

Resultados. Los análisis NGS permitían identificar al menos una mutación en un 93,3% de los casos, mientras que la citogenética sólo era positiva en un 40%. *TET2* constituye el gen más frecuentemente mutado en nuestro grupo y las alteraciones en *SF3B1* son las únicas identificadas con una asociación fenotípica clara, correspondiéndose con la presencia de sideroblastos en anillo.

Conclusiones. El estudio NGS permite identificar mutaciones en un mayor número de pacientes que los estudios tradicionales. Las alteraciones más frecuentemente detectadas implican genes cuya expresión comprende ciertos componentes del mecanismo de splicing, reguladores epigenéticos y mecanismos de control histónico.

Los pacientes analizados manifestaban un fenotipo más agresivo a medida que aumentaba el número de mutaciones, derivando en fenotipos con exceso de blastos y transformación a Leucemia Mieloide Aguda.

Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) is a term employed to name a group of pathologies which affect the hematopoietic stem cell and which are distinguished by ineffective hematopoiesis in at least one hematological cell line, dysplastic morphology and clonal evolution potential.

The use of cytogenetics on its diagnosis has led to more innovative approaches, albeit complementary, like molecular characterization through new massive generation sequencing (NGS) techniques.

Hypothesis and aims. This research attempts to integrate the information given by the mutational study performed through NGS massive sequencing technologies with conventional cytogenetic approaches and to observe the significance of the found genetic anomalies as well as their prospective applications.

Material and methods. Study of a cohort of 15 adult patients, who had previously undergone cytogenetic analysis and were later examined using massive sequencing procedures in order to find new mutations.

The DNA panel employed involves all accorded genes defined in PETHEMA agreement and covers the coding region and hotspots of mutations in 40 genes.

Results. NGS studies were able to identify at least one mutation in a 93,3% of our cases, while cytogenetics was positive in only a 40%. TET2 appears as the gene more frequently mutated in our group and SF3B1 variations are the only ones identified with a clear phenotypic association, being consistent with ring sideroblast presence.

Conclusions. NGS studies allow the identification of mutations in a higher number of patients than conventional studies. The more frequently reported mutations affected genes whose expression comprehends RNA splicing machinery, epigenetic regulators and histone modification factors.

Our patients showed poorer prognosis and more aggressive phenotypes when the number of mutations detected increased, resulting in phenotypes with excess of blast and progression to Acute Myeloid Leukemia.

Resumo

As síndromes mielodisplásicas (SMD) constitúen un grupo de patoloxías que afectan á célula nai hematopoética, caracterizadas pola produción ineficaz nunha ou máis liñas celulares, morfoloxía displásica e potencial de evolución clonal debido á adquisición de mutacións en diversos xenes.

O uso de técnicas de citoxenética no seu diagnóstico deu paso a abordaxes máis innovadoras aínda que complementarias, como é a caracterización molecular mediante o uso de técnicas de secuenciación masiva NGS.

Hipótese e obxectivos. Este estudo pretende integrar a información que nos permite obter o estudo de mutacións realizado por técnicas de secuenciación masiva NGS cos da citoxenética convencional e comprobar cal é o significado das alteracións atopadas e as súas posibles aplicacións.

Metodoloxía. Análise dunha cohorte de 15 suxeitos aos que se realizou previamente estudos de citoxenética e que, posteriormente, foron sometidos a un estudo de mutacións mediante procedementos de secuenciación masiva. O panel de ADN empregado inclúe os xenes consenso definidos no convenio PETHEMA e cobre a rexión codificante e hotspots de mutacións en 40 xenes.

Resultados. As análises NGS permitían identificar polo menos unha mutación nun 93,3% dos casos, mentres que a citoxenética só era positiva nun 40%. *TET2* constitúe o xene máis frecuentemente mutado no noso grupo e as alteracións en *SF3B1* son as únicas identificadas cunha asociación fenotípica clara, correspondendo coa presenza de sideroblastos en anel.

Conclusións. O estudo NGS permite identificar mutacións nun maior número de pacientes que os estudos tradicionais. As alteracións máis frecuentemente detectadas implican xenes cuxa expresión comprende certos compoñentes do mecanismo de splicing, reguladores epixenéticos e mecanismos de control histónico.

Os pacientes analizados manifestaban un fenotipo máis agresivo a medida que aumentaba o número de mutacións, derivando en fenotipos con exceso de blastos e transformación a Leucemia Mieloide Aguda.

1. INTRODUCCIÓN

Los síndromes mielodisplásicos son un grupo de patologías muy heterogéneas, de índole neoplásica, que se caracterizan por una hematopoyesis inefectiva, con presencia de displasia en las células sanguíneas en médula ósea y citopenias que se evidencian en sangre periférica, así como un riesgo incrementado de progresión a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) por alteraciones en la célula madre pluripotencial (1).

Cuando se habla de síndromes mielodisplásicos se suele hacer referencia a los síndromes mielodisplásicos primarios, que habitualmente aparecen en pacientes de avanzada edad, siendo por tanto entidades que suelen manifestarse en población moderadamente envejecida. La media de debut de la enfermedad se sitúa entre los 72 y los 75 años (2). Si bien es cierto que pueden aparecer en individuos de menor edad, su presentación en niños o jóvenes ha de hacernos sospechar de cierta predisposición genética debida a mutaciones que afecten a la línea germinal y en síndromes que se derivan de ello (2).

En su descripción inicial (FAB) se consideró que el rasgo distintivo de los síndromes mielodisplásicos era la dispoiesis: la diseritropoyesis, la disgranulopoyesis y la dismegarocitopoyesis (alteraciones en los precursores eritroides, mieloides y megacariocíticos de tipo cualitativo y cuantitativo) (3). Sin embargo, los avances en biología molecular han permitido refinar los criterios diagnósticos de las diferentes entidades, siendo la clasificación de la OMS de 2016 la que se encuentra vigente en la actualidad (1).

Del mismo modo, las nuevas técnicas de secuenciación génica han facilitado el descubrimiento de las características y perfiles moleculares de multitud de enfermedades y hemos podido perfilar de esta manera las alteraciones más habituales en las neoplasias hematológicas (4). Más de 40 genes diferentes aparecen mutados en los síndromes mielodisplásicos, y más del 80% de los pacientes que son diagnosticados con este grupo de enfermedades poseen al menos una mutación (4). El descubrimiento de estas alteraciones genéticas nos ha permitido profundizar en la patogenia de la mielodisplasia, redefinir las consideraciones diagnósticas y las aproximaciones pronósticas e incluso buscar nuevas dianas terapéuticas para optimizar los tratamientos farmacológicos (5).

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

Durante muchos años, los síndromes mielodisplásicos fueron considerados simplemente una mera condición preleucémica, debido a la relativa tasa de progresión a esta patología que manifiestan (6), sin disponer de registros rigurosos sobre ellos y sus características hasta el año 2001, aproximadamente (6).

En el año 1976 el grupo de la FAB (French-American-British) publica la clasificación de aspectos morfológicos de las leucemias agudas, que fue ampliamente aceptada y acogida por la comunidad científica (3). En ella se hacía una distinción entre los principales tipos de leucemia aguda, que se caracterizaban por los síntomas de aparición brusca y que requerían tratamiento inmediato, y un amplio espectro de afecciones que solían presentarse en pacientes mayores de 50 años y que fueron descritas como “síndromes mielodisplásicos o dismielopoyéticos”, en los cuales el tratamiento no parecía ser tan urgente (3).

Se propuso entonces que la diferencia entre ambas patologías podía establecerse de acuerdo al número de mieloblastos y promielocitos hallados en médula ósea, fijándose así un punto de corte de 30% de la celularidad total como máximo para los SMD y más del 50% para realizar el diagnóstico de leucemia, considerándose que los valores entre ambos (30-50%) correspondían a un estado de progresión o transición entre ambas entidades (3). Posteriormente, se establece que un 30% de blastos es suficiente para realizar el diagnóstico de LMA (3).

En el año 2000 la OMS modificó su postura respecto a los SMD, perdiendo su carácter de “incertidumbre sobre benignidad o malignidad” y considerándolos “malignos” (6). Como consecuencia de esto, en el año 2001 se comenzaron a reportar casos al programa SEER, uno de los registros más potentes en cuanto a tamaño muestral y de mayor calidad de los Estados Unidos, dependiente del Instituto Nacional del Cáncer Americano (7).

Desde su definición como entidad independiente de las leucemias, el número de pacientes diagnosticados con síndromes mielodisplásicos se ha incrementado considerablemente con el paso de los años. Esto se puede atribuir a varios factores: cambios demográficos, mejora de los cuidados geriátricos, en el manejo de las comorbilidades y de los métodos diagnósticos e incluso aumento en la exposición a agentes oncogénicos, siendo el envejecimiento generalizado de la población el factor que parece estar más implicado en este hecho (8).

El manejo de los pacientes con SMD es complejo debido a la avanzada edad de los pacientes (media entre 70 y 75 años al diagnóstico), las comorbilidades no hematológicas que tienden a presentarse en la edad avanzada y la poca tolerancia que muestran a los tratamientos más agresivos, teniendo un pronóstico aciago en los casos de progresión a leucemia (9).

1.1.1 INCIDENCIA Y PREVALENCIA

Definimos “**Incidencia**” como el número de casos nuevos que aparecen de una enfermedad en una población (6). En lo que respecta a la incidencia de Síndromes Mielodisplásicos, las cifras globales no son conocidas con exactitud (6). En Estados Unidos algunos estudios consideran que la incidencia oscila entre 3 y 4 casos por 100.000 habitantes por año, aumentando esta cifra hasta los 30 casos por 100.000 habitantes en pacientes mayores de 70 años (5). No obstante, si nos ceñimos a los datos del programa SEER,

encontramos que en la población general se considera que la tasa de incidencia de los SMD llegaría incluso a 4,5 casos por 100.000 habitantes por año (10).

Mientras que se trata de un grupo de patologías que son muy poco habituales en niños, adolescentes y adultos jóvenes (tasa de incidencia de 0,1 casos por 100.000 habitantes y año en pacientes menores de 40 años), la tasa de incidencia aumentaría hasta 26,9 casos por 100.000 habitantes y año en torno a los 70 años e incluso a 55,4 casos por 100.000 habitantes y año en pacientes mayores de 80 años (10).

- En lo que respecta al **sexo**, la incidencia es similar en jóvenes, siendo levemente mayor en individuos de sexo masculino. A partir de los 70 años se observa un marcado predominio masculino, que se dispara en el grupo de más de 80 años (tasa de 83,8 casos por 100.000 habitantes y años en hombres frente a 38,5 en mujeres) (10).
- Desde el punto de vista **racial** no se observan grandes diferencias, siendo la población caucásica la más afectada (4,7 casos por 100.000 habitantes por año) y los casos menos frecuentes en asiáticos y nativos americanos (3 y 2,7 respectivamente) (10).

La “**Prevalencia**”, por su parte, informa sobre el porcentaje de una población que sufre una enfermedad en un momento determinado (6). Las estimaciones que existen sobre pacientes con síndromes mielodisplásicos son muy poco claras: los datos obtenidos por grupos de investigación alemanes reflejan una prevalencia de 20,7 casos por cada 100.000 habitantes (6). Si además se tiene en consideración que alrededor de un 11 % de la población americana mayor de 65 años padece anemia y en un tercio de estos casos la causa es desconocida (encontrándose en el 17,2% de los casos de anemia inexplicada características comunes a los síndromes mielodisplásicos como son la macrocitosis o la neutropenia), parece oportuno señalar que los síndromes mielodisplásicos podrían encontrarse tras ella, lo que los convertiría en una dolencia mucho más habitual de lo que se presume (6).

Al analizar las variables de sexo, edad y raza, los estudios demuestran que mientras la edad y el sexo sí juegan un factor determinante y que condiciona el pronóstico (mayor mortalidad en pacientes de mayor edad y sexo masculino), la raza no parece influir en la supervivencia (7). No obstante, parece importante remarcar que dada la heterogeneidad de las patologías que comprenden el grupo de los SMD, el pronóstico y desenlace de cada paciente es extremadamente variable, oscilando la supervivencia media entre menos de 6 meses en los casos más agresivos y más de 5 años en otros de curso más indolente (5,7).

1.1.2 FACTORES ETIOGÉNICOS

La etiología de los síndromes mielodisplásicos no ha sido claramente establecida, aunque se conocen varios factores que pueden predisponer su aparición. Cuando se sospecha un SMD en pacientes jóvenes (niños, adolescentes o adultos menores de 40 años) se deben descartar determinadas enfermedades congénitas, como la anemia de Fanconi, la disqueratosis

congénita o el síndrome de Down, que favorecen el riesgo de aparición de los llamados “**síndromes mielodisplásicos de la línea germinal**” (5). Su detección temprana permite una mayor monitorización de las manifestaciones hematológicas así como de su posible progresión (2). En estos casos, la supervivencia se incrementa al realizar el tratamiento con Trasplante de Precursores Hematopoyéticos antes de la evolución a leucemia, en cuyo caso el pronóstico tiende a ser muy pobre (2).

Se han establecido igualmente factores de riesgo que pueden favorecer la aparición de mutaciones que conduzcan al desarrollo de SMD. Las radiaciones ionizantes o el uso de agentes quimioterápicos para el tratamiento de neoplasias previas figuran entre ellos, así como la exposición al benceno (6). La principal fuente de exposición a benceno es el humo del tabaco, aunque puede encontrarse en determinados caso de exposición laboral por pinturas o pesticidas (6).

Es necesario destacar que los pacientes que desarrollan SMD tras haber recibido terapias para el tratamiento de otros procesos oncológicos suelen tener un pronóstico muy sombrío. Este grupo recibe el nombre de “**SMD secundarios o relacionados con la terapia**” (6). Se trata de una categoría de SMD que aglutina pacientes que previamente han recibido tratamiento con radiaciones ionizantes o fármacos citotóxicos o inmunosupresores a causa de una enfermedad tumoral previa (8). Los fármacos más frecuentemente asociados en su aparición son los alquilantes. El intervalo de tiempo entre la aparición de los síntomas y la exposición al factor presumiblemente etiológico es muy variable (8).

1.1.3 FACTORES PRONÓSTICOS

Se ha demostrado que los factores que influyen en el pronóstico de los pacientes con SMD son diversos, incluyendo el sexo, la edad, la dependencia transfusional, el subtipo de síndrome mielodisplásico, el porcentaje de células blásticas en la médula ósea, el número de citopenias observadas y las características citogenéticas (6).

Las tres últimas variables (blastos, citopenias y citogenética) representan factores decisivos en múltiples modelos pronósticos para pacientes con SMD como el International Prognostic Scoring System (IPSS) (11). Por su parte, el cariotipo, el subtipo y la dependencia transfusional condicional el modelo de la OMS (WPSS) (11).

En el apartado de las comorbilidades se sabe que diversas enfermedades, tales como la insuficiencia cardíaca congestiva o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica acortan la supervivencia (6). La relación es ambivalente, puesto que se trata de patologías que se ven empeoradas por la anemia o las infecciones, consecuencias de los SMD, y al mismo tiempo dificultan el tratamiento con fármacos quimioterápicos como las antraciclinas, facilitando la progresión de la enfermedad tumoral (6).

1.2 ETIOPATOGENIA

Tal y como se mencionaba al inicio del capítulo, la presencia de displasia y citopenias son algo esencial en los síndromes mielodisplásicos, pero la OMS también recalca la naturaleza clonal que tiene la hematopoyesis en este grupo de patologías (1). La presencia de anomalías cromosómicas o genéticas se puede apreciar en los precursores hematopoyéticos, pero parece claro que la célula que sufre dichas mutaciones debe de mantener su capacidad de proliferación y cierta diferenciación (12). Sabemos que en los pacientes con SMD casi todas las células de las diferentes líneas mieloides proceden de un mismo clon, y esto es algo que se puede apreciar en cualquier estadio, no solamente cuando se evoluciona a leucemia (12).

Las etapas que tienen lugar son las que habitualmente se asocian con la carcinogénesis:

1. **Comienzo:** en el que tienen lugar las primeras lesiones en la célula madre hematopoyética (13).
2. **Proliferación tumoral:** en la que tiene lugar la expansión clonal del clon aberrante y que suele acompañarse de hematopoyesis inefectiva (13).
3. **Transformación maligna:** en la que aumenta el número de células blásticas hasta el desarrollo de leucemia (13).

Inicialmente se considera que tiene lugar una mutación en una célula madre hematopoyética inmadura, que mantiene su capacidad de renovación y proliferación (12). Por lo general, esta mutación aporta ventajas selectivas a esta célula, facilita su supervivencia y crecimiento y dificulta los fenómenos apoptóticos, contribuyendo a su multiplicación y expansión clonal (12).

Debido a las características adquiridas, el clon de células hematopoyéticas mutadas migra a otras partes del organismo y de manera progresiva se asienta en el resto de tejidos de médula ósea (12). Se alcanza así, de manera progresiva, una situación de preponderancia en el resto de las regiones hematopoyéticas del organismo.(12). La expansión continúa su curso y se llega a un punto en el cual casi todas las células de la médula ósea son ya derivadas del clon primitivo y por tanto portan la misma mutación inicial, así como otras que tienen lugar mientras los clones continúan su proceso de proliferación e invasión (12).

Las manifestaciones clínicas que encontramos en los pacientes se deben en esencia a una diferenciación incorrecta y a una falta de maduración en los precursores hematopoyéticos (12). Este hecho lleva a que aparezcan rasgos displásicos y al mismo tiempo citopenias en sangre periférica, derivadas de la hematopoyesis ineficaz y resultado de la excesiva apoptosis, prematura e intramedular, de los precursores (12). Si combinamos esta situación, junto a las ventajas en la supervivencia que muestra el clon inicial, podemos asumir que las mutaciones que permiten una ganancia de función a nivel de la célula madre hematopoyética y facilitan su supervivencia, implican a su vez una pérdida de función en los diferentes precursores (12,14).

La adquisición de mutaciones posteriores, que afectan a multitud de genes implicados en mecanismos como las modificaciones de la cromatina o la regulación de la transcripción del ARNm, da lugar a multitud de subclones que cada vez ven más comprometida su capacidad de diferenciarse en células maduras (12). Como resultado de esto, el número de blastos se irá incrementando, llegando al punto de corte en el cual podemos considerar que el Síndrome Mielodisplásico ha progresado a una Leucemia Mieloide Aguda (12).

Las mutaciones que aparecen en la célula y que hacen que el clon en cuestión acabe siendo dominante no siempre se expresan de manera clínica. Mientras que las mutaciones que afectan a *SF3B1* parecen ser causa de un fenotipo directamente relacionado (SMD-SA) (1), alteraciones como las que afectan al gen *TET2* determinan una expansión y hematopoyesis clonal pero sin que se encuentren otras manifestaciones en la mayoría de los sujetos (12). Este hecho sugiere que para que tenga lugar la expresión clínica de estas alteraciones puede ser necesaria la coexistencia de varias, en función del gen que se vea afectado (12).

1.2.1 EVOLUCIÓN A LMA

Cuando la enfermedad progresa, los pacientes con SMD poseen un elevado riesgo de desarrollar una leucemia. La teoría más aceptada para explicar este hecho consiste en que la adquisición de mutaciones en el clon inicial darían lugar a diferentes subclones, con sus propias mutaciones y características diferenciales, que permitirían una mayor expansión de los clones tumorales, cada vez menos diferenciados (12,15). La apoptosis, que es excesiva en la condición de SMD, pasa a ser insuficiente cuando se produce la evolución a leucemia y no es capaz de frenar la multiplicación incontrolada de las células blásticas, que cada vez ocupan una mayor proporción de la médula ósea e incluso aparecen en la sangre periférica (13).

El clon que da lugar al SMD persiste en la LMA, manteniendo siempre las mutaciones adquiridas al inicio durante toda su evolución, por lo que se ha sugerido que las terapias dirigidas a las mutaciones más precoces podrían ser muy efectivas a la hora de aumentar la susceptibilidad a los tratamientos quimioterápicos tradicionales (15).

Aunque actualmente la distinción entre LMA y SMD recae en el número de blastos encontrados (siendo el 20% el punto de corte elegido), la detección de mutaciones podría ser un mejor indicador del estado de la enfermedad. (15).

1.3 CLASIFICACIONES

Dos décadas después de la publicación de la primera clasificación de los SMD por la FAB, un comité formado por patólogos y hematólogos de renombre internacional formuló la primera clasificación de neoplasias hematológicas de la OMS en 2001, que incluía los SMD, la LMA, los síndromes mieloproliferativos (MPN) y las neoplasias “overlap” o intermedias

entre SMD y MPN (16). Actualmente, y después de la evolución de otras clasificaciones y propuestas intermedias, nos regimos por la clasificación de la OMS publicada en 2016 (1).

1.3.1 CLASIFICACIÓN DE LA FAB

Tal y como se ha mencionado previamente, el grupo de la FAB decidió que debían separarse las Leucemias Mieloides Agudas de ciertos estados preleucémicos en los cuales la progresión de la enfermedad era mucho menor (3). Se distinguían 5 tipos de síndromes mielodisplásicos, a saber:

- **Anemia Refractaria (AR):** anemia como síntoma fundamental, reticulocitopenia, alteraciones en los precursores eritroides y ausencia de blastos (3).
- **Anemia Refractaria con Sideroblastos en Anillo (ARSA):** cuadro similar al anterior pero con presencia de más de un 15% de sideroblastos en anillo, con gránulos sideróforos en torno al núcleo, en médula ósea (3).
- **Anemia Refractaria con Exceso de Blastos (AREB):** alteraciones en las tres líneas, marcada disgranulopoyesis. Blastos entre un 5% y un 20% en médula ósea (3).
- **Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMoC):** caracterizada por monocitosis absoluta (3).
- **Anemia Refractaria con Exceso de Blastos en Transformación:** citopenias que no cumplen criterios para ser diagnosticadas como LMA y el número de blastos en médula se sitúa entre un 20% y un 30%(3).

1.3.2 CLASIFICACIÓN DE LA OMS 2016

La clasificación de la OMS de 2008 representaba una revisión de la publicada en 2001, y que había incluido por primera vez información genética sobre las neoplasias mieloides (16). En ella, los síndromes mielodisplásicos aparecían como uno de los mayores retos de la Hematología, una de las neoplasias mieloides más difíciles de diagnosticar y clasificar (17).

Posteriormente vino la clasificación de 2016, la más empleada actualmente (1). Para poder sospechar un SMD se aconseja tener en cuenta dos condiciones: una citopenia estable (de al menos 6 meses de duración, salvo que vaya acompañada de displasia en dos líneas celulares o algunas alteraciones cariotípicas específicas, en cuyo caso 2 meses es suficiente) y la exclusión de otras posibles causas para la citopenia o la displasia (9).

Para poder realizar el diagnóstico es preciso que también estén presentes al menos uno de estos tres requisitos: displasia ($\geq 10\%$ en una o más líneas celulares en la médula ósea), un número de blastos que oscile entre el 5 y el 19% o alguna anomalía cariotípica específicamente asociada a SMD (9). Aunque las citopenias parecen ser condición “sine qua non” en el diagnóstico de los SMD, las clasificaciones dan más importancia a la displasia o los blastos que a las citopenias específicas (1). En lo que a las anomalías referidas en el campo de la citogenética respecta, la trisomía del cromosoma 8 (+8), la delección del Y (-Y) o

la delección del 20q no se consideran definitorias de SMD si no hay otros rasgos morfológicos característicos de Mielodisplasia (1). La delección del brazo largo del cromosoma 5, del(5q), se considera la única anomalía que es definitiva de un subtipo específico de SMD (1).

La actual clasificación de la OMS considera que podemos hablar de 6 tipos distintos de síndromes mielodisplásicos (7 si dividimos el SMD con Exceso de Blastos en dos en función del porcentaje de células blásticas), que son los siguientes: SMD con displasia unilínea (SMD-DUL), SMD con displasia multilínea (SMD-DML), SMD con Sideroblastos en Anillo (SMD-SA), SMD con Exceso de Blastos (SMD-EB (I y II)) y SMD con delección del brazo largo del cromosoma 5 (SMD-5q) (1,9).

SUBTIPO DE SMD	SANGRE PERIFÉRICA	HALLAZGOS EN MÉDULA ÓSEA
SMD con displasia unilínea	Citopenia única o bicitopenia	Displasia en $\geq 10\%$ de una sola línea celular, $< 5\%$ de blastos.
SMD con displasia multilínea	Citopenia(s), $< 1 \times 10^9/L$ monocitos	Displasia en $\geq 10\%$ de al menos 2 linajes celulares, $< 5\%$ de blastos y sin cumplir criterios de SMD-SA
SMD con sideroblastos en anillo	Anemia, sin blastos	$\geq 15\%$ de precursores eritroides con sideroblastos en anillo o $\geq 5\%$ de sideroblastos si está mutado <i>SF3B1</i> .
SMD con exceso de blastos I	Citopenia(s), $< 1 \times 10^9/L$ monocitos	Displasia en una o varias líneas celulares, 5%-9% de blastos, no se evidencian bastones de Auer.
SMD con exceso de blastos II	Citopenia(s), $< 1 \times 10^9/L$ monocitos	Displasia en una o varias líneas celulares, 10%-19% de blastos, pueden verse bastones de Auer.
SMD con delección del 5q	Anemia. A veces trombocitosis	Displasia unilínea eritroide, delección del 5q, $< 5\%$ de blastos \pm otras anomalías distintas a -7/del (7q).
SMD clasificable	Citopenias, $\pm 1\%$ de blastos en 2 ocasiones	Displasia unilínea o ausencia de displasia pero características citogenéticas de SMD, $< 5\%$ de blastos.

Tipos de SMD y características en el examen de la médula ósea y sangre periférica (1,9)

Algunas consideraciones deben realizarse respecto a los diferentes tipos de SDM:

- ❖ El **SMD-DUL** incluye las citopenias mantenidas de las 3 líneas celulares, aunque en el caso de trombocitopenia el punto de corte de displasia puede elevarse del 10 al 40%, dado que no es inusual encontrar megacariocitos displásicos en una médula normal (9,18).
- ❖ En los **SMD-SA** podemos hacer una división entre aquellos que presentan displasia en una línea o en varias (1,9). La presencia de mutación en *SF3B1* se asocia a la aparición de sideroblastos en anillo y el pronóstico es favorable (1).

- ❖ El **SMD-5q** se caracteriza por dicha anomalía en ausencia de un exceso de blastos (5). No es raro que haya otras alteraciones cromosómicas, que no afectan al pronóstico salvo que se trate de la del(7q) o mutaciones en *TP53*, ensombreciéndolo ambas (1,5). Fue descrito en 1974 con trombocitosis, anemia macrocítica y megacariocitos hipolobulados junto a mínima displasia en el resto de linajes celulares como características (5). Generalmente, el pronóstico es bueno, y la respuesta a Lenalidomida es especialmente efectiva (9).
- ❖ El **SMD-EB** y el **SMD-EB-T** (con Exceso de Blastos en Transformación) tienen el peor pronóstico, con una supervivencia media que oscila entre los 5 y 12 meses (9).
- ❖ **SMD Inclasificable** es un término que abarca muchas situaciones: desde displasia unilineal y pancitopenia, pero ausencia de blastos, a pacientes que manifiestan un 1% de blastos en sangre periférica pero <5% en médula ósea (1). También se incluyen en este apartado los pacientes que manifiestan anomalías citogenéticas definitorias como del(5q) o monosomía del 7 pero el estudio de la médula no es concluyente (16).

Podemos establecer dos grupos, de alto y de bajo riesgo (principalmente, en función de si se encuentra más o menos de un 5% de blastos en el examen de la médula ósea) (16). Los pacientes con SMD-EB y SMD-EB-T constituyen el grupo de alto riesgo por su probabilidad de progresión a LMA, siendo el resto de bajo, con una mayor supervivencia media (9). El SMD-SA apenas leucemiza, y el pronóstico es bastante bueno, con una supervivencia que puede sobrepasar los 6 años (9).

La distinción entre LMA y SMD ha sido y continúa siendo un área de intenso debate (9). Aunque la FAB consideraba que 30% era el punto de corte para los blastos en médula ósea en un SMD (3,9), la OMS en 2001 estableció que este debía de ser menor del 20%, por lo que se pasó a clasificar a los pacientes que oscilaban entre 20 y 29% de blastos como “Leucemias Agudas con cambios relacionados con la Mielodisplasia” (9). No obstante, dado que las LMA *de novo* manifiestan rasgos biológicos diferentes a las secundarias a un SMD, se ha recuperado el término “SMD con Exceso de Blastos en Transformación” de la clasificación original de la FAB para estos pacientes que tienen entre un 20% y un 29% de blastos y que poseen un mejor pronóstico y mejor respuesta a tratamiento que otras LMA (9).

1.4 CITOPENIAS

El espectro de trastornos hematopoyéticos mieloides de características indolentes abarca fundamentalmente cuatro grupos, a los que cuales resulta habitual referirse por sus iniciales: ICUS (Citopenia Idiopática de Significado Incierto), IDUS (Displasia Idiopática de Significado Incierto), CCUS (Citopenia Clonal de Significado Incierto) y CHIP (Hematopoyesis Clonal de Significado Incierto) (4). Todos ellos pueden evolucionar a SMD o LMA aunque la frecuencia de esta transformación varía en cada grupo (9).

El término **ICUS** hace referencia a una citopenia persistente durante más de 6 meses e inexplicada, con incapacidad para establecer un diagnóstico de SMD (19). También se ha de excluir la displasia en los tres principales linajes celulares (19). Se postula que la producción inadecuada de citoquinas asociadas a la proliferación de los diferentes linajes celulares podría esconderse tras esta situación (19). Puede realizarse una subdivisión en cuatro grupos en función de si hay anemia, neutropenia, trombocitopenia o bi/pancitopenia (19).

El término **IDUS** se aplica a pacientes que manifiestan una mielopoyesis displásica pero que sin embargo carecen de citopenias (19,20). El diagnóstico solamente puede realizarse cuando además de apreciarse los cambios displásicos en la médula ósea el recuento sanguíneo permanece inalterado al menos 6 meses (19). En este caso, estamos ante una situación en la que la producción hematológica es normal a pesar de haber sido reemplazada la médula en casi su totalidad por un clon celular, lo que implicaría que o bien el nuevo clon conserva características que le permiten diferenciarse en precursores hematopoyéticos, o que existen reductos de células madre que permiten mantener la hematopoyesis de manera normal (19).

Algunos de los pacientes con citopenias persistentes van a poseer mutaciones somáticas que aportan un carácter clonal a la hematopoyesis (21). Podemos referirnos a ella con el término **CCUS** (21). Los pacientes con esta condición manifiestan un porcentaje mayor de mutaciones que aquellos con CHIP, siendo estas alteraciones más habitualmente de pronóstico adverso, incluso aproximándose en algunas ocasiones a los pacientes que poseen SMD de bajo riesgo (21). Los pacientes con CCUS poseen un riesgo mucho mayor que el de cualquiera de las otras tres alteraciones de desarrollar una neoplasia hematológica franca (22).

Finalmente, se debe destacar el hecho que los precursores y las células madre de la médula ósea van acumulando mutaciones a lo largo de la vida, muchas de las cuales no son patogénicas o al menos carecen de potencial para dar lugar a consecuencias funcionales (20). Las alteraciones relacionadas con el envejecimiento en las células hematopoyéticas son un hallazgo relativamente común en pacientes mayores de 60 años (20), y personas aparentemente sanas pueden albergar clones hematopoyéticos que son responsables del 10-20% de todas sus células circulantes (21). Los estudios de secuenciación completa del exoma han demostrado que la incidencia de hematopoyesis clonal se eleva con la edad, hasta el punto que más del 15% de los pacientes con más de 75 años pueden manifestar estas alteraciones (21). Si bien es cierto que se trata del grupo de edad en el que resulta más habitual la aparición de SMD, la incidencia de estos es mucho más inferior que la de esta situación de mera clonalidad, por lo que queda claro que la mayoría de los individuos afectados no desarrollan neoplasias hematológicas (21).

Lo anteriormente expuesto dio lugar al término **CHIP**, aplicado a pacientes que manifiestan mutaciones típicamente asociadas a SMD y cierta clonalidad, pero que no cumplen criterios de SMD (20,21). Se estima que la progresión a neoplasia es del 0,5-1% por año y afecta fundamentalmente a pacientes que presentan más de un 20% de células clonales

en sangre (21). En líneas generales se considera que el pronóstico es bueno, dada la baja progresión, la ausencia de citopenias y la supervivencia mucho mayor que en SMD (20). Sin embargo, también se ha descrito que los pacientes con CHIP poseen una tasa más elevada de mortalidad cardiovascular, por lo que estaríamos ante una situación que si bien no tiene por qué ser maligna sí que revestiría cierta importancia clínica (4,21).

La siguiente tabla resume las características principales de los diferentes tipos de alteraciones hematológicas indolentes y su comparativa con los SMD (4,19,21):

	ICUS	IDUS	CCUS	CHIP	SMD
Citopenias	Sí (≥ 1)	No	Sí (≥ 1)	No	Sí (≥ 1)
Displasia	No (mínima)	Sí	No (mínima)	No (mínima)	Sí
Mutaciones	No	No	Sí	Sí	Sí >85%
FAV			30-40%	2-12%	30-50%
R. Progresión	>10% (5 años)	>10% (5 años)	>85% (5 años)	0.5-1% por año	

FAV, Frecuencia Alélica de la Variante. **ICUS**, Citopenia Idiopática de Significado Incierto. **IDUS**, Displasia Idiopática de Significado Incierto. **CCUS**, Citopenia Clonal de Significado Incierto. **CHIP**, Hematopoyesis Clonal de Significado Incierto. **SMD**, Síndrome Mielodisplásico.

1.5 S. MIELODISPLÁSICOS/MIELOPROLIFERATIVOS

Esta categoría fue incorporada en 2008 para poder incluir neoplasias mieloides que compartían características clínicas, de laboratorio y morfológicas de síndrome mielodisplásico y neoplasia mieloproliferativa crónica (17). Por tanto, nos encontramos ante una categoría de solapamiento, en la cual se entremezclan rasgos de ambos grupos de patologías (17). En este grupo el cariotipo suele ser normal, aunque puede mostrar anomalías similares a las de los SMD (1). Se engloban en esta categoría la Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMoC), la Leucemia Mieloide Crónica atípica (aLMC), la Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMMoJ) y una entidad conocida como fenotipo intermedio SDM/NMP con Sideroblastos en Anillo y Trombocitosis (SMD/NMP-SA-T) (1).

1.5.1 LEUCEMIA MIELOMONOCITICA CRÓNICA

Inicialmente fue considerada un SMD por la FAB (3). Se trata del subtipo más habitual de la categoría SMD/NMP, es predominantemente masculina y posee una incidencia de 1 caso por 100.000 habitantes y año (3 casos por 100.000 habitantes y año en mayores de 60 años (23)) y una edad media de diagnóstico en torno a los 70 años (24).

La LMMoC es una enfermedad clonal en la que se altera la célula madre hematopoyética y que se caracteriza por monocitosis persistente (definida como un aumento de monocitos de manera estable ($> 1 \times 10^9/L$) en sangre periférica, ausencia de cromosoma Philadelphia (reordenamiento *BCR-ABL*), ausencia de alteraciones en el gen *PDGFRB*, porcentaje de

blastos menor del 20% en médula ósea y displasia celular de al menos una línea mieloide (1,24).

Esta patología puede subdividirse en dos clases en función de si la leucocitosis persistente es mayor o menor de $13 \times 10^9/L$ (23). Los casos en los que esta cifra sea mayor serán catalogados como LMMoC Mieloproliferativa y los que tengan cifras menores como tipo Mielodisplásico (23). Si bien es cierto que los pacientes con cifras más elevadas de leucocitos manifiestan un mayor índice de esplenomegalia, ambos tipos muestran un grado similar de cambios displásicos, y en ambos casos el valor que realmente define el pronóstico es el porcentaje de células blásticas (23).

En función del porcentaje de células blásticas en médula y sangre podemos estratificar en tres subtipos: LMMoC-0, con $<2\%$ en sangre y $<5\%$ en médula, LMMoC-1, con 2-4% en sangre y 5-9% en médula, y LMMoC-2, con 5-19% en sangre y 10-19% en médula (1,24).

El diagnóstico suele ser casual y la sintomatología puede ser la derivada de las citopenias, como la anemia, y de la hematopoyesis extramedular (en casos de una monocitosis muy elevada), como la esplenomegalia o la hepatomegalia, infiltración cutánea e incluso se han descrito manifestaciones autoinmunes como vasculitis (24). La supervivencia es muy heterogénea, con una media de 3 años, aumentando en los últimos años por el uso de agentes hipometilantes en el tratamiento, que son particularmente efectivos (24). Evoluciona a LMA en un 20-30% de los pacientes (24).

1.6 ABORDAJE DIAGNÓSTICO

A la hora de realizar la evaluación clínica de un paciente con sospecha de SMD se debe tener en cuenta el tiempo de evolución y gravedad de las citopenias, si ha necesitado o no transfusiones previamente o cuáles son sus comorbilidades (9,14). La historia clínica es, por tanto, fundamental. Además de los análisis cuantitativos en sangre periférica, se precisa la realización de frotis a fin de determinar el grado de displasia (9). Los niveles de LDH (lactato deshidrogenasa) deben de analizarse, puesto que si están elevados son indicativos de una marcada inflamación sistémica como resultado de destrucción tisular o hemólisis y por tanto se consideran predictores de una supervivencia reducida (25).

Los aspirados y biopsias de médula ósea son necesarios a fin de determinar cuál es el grado y la proporción de células progenitoras anormales en ella, los blastos, la fibrosis o la presencia de sideroblastos en anillo (9,14) (para lo cual es imprescindible realizar la llamada tinción de Perls (azul de Prusia), cuya utilidad ya había sido descrita por la FAB (26)). Los análisis citogenéticos son esenciales para identificar anomalías cromosómicas, que condicionan el diagnóstico pero también el pronóstico (9,14). También puede ser útil el uso de FISH e inmunofenotipación (9,14).

1.6.1 SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN

La NGS (secuenciación de nueva generación) es el término empleado para describir un tipo de tecnología de secuenciación del ADN que ha revolucionado en los últimos años la investigación en genómica (27). A diferencia de los métodos anteriores, no se requiere la clonación de fragmentos de ADN en bacterias, sino que se preparan una serie de bibliotecas NGS en un sistema no celular, las millones de reacciones de secuenciación tienen lugar en paralelo y no se requiere electroforesis para la interpretación de los resultados (28). Existen múltiples plataformas con diferentes tecnologías pero todas ellas realizan la secuenciación de millones de pequeños fragmentos de ADN de manera simultánea, por lo que, como se ha dicho, se trata de un método mucho más rápido que el método Sanger (27). Además, el coste se ha reducido mucho, extendiéndose su uso (28).

La información obtenida se emplea para, a través de análisis bioinformáticos, reconstruir los fragmentos utilizando para ello las lecturas del genoma humano de referencia (27). Cada una de los tres billones de bases en el genoma humano es secuenciada varias veces, por lo que se obtiene una enorme profundidad de análisis, que además de aportar gran cantidad de información es capaz de identificar variaciones desconocidas en el ADN (27).

Las tecnologías NGS pueden emplearse para secuenciar genomas enteros o en su lugar restringirse a áreas específicas de interés, ya sean todos los genes codificantes o solo algunos de ellos, y detectar múltiples alteraciones génicas, desde cambios de bases o delecciones a reordenamientos (27). Por tanto, es una técnica no selectiva y puede encontrar mutaciones que previamente no habían sido descritas, así como identificar o cuantificar transcritos que no eran conocidos (27,28). También es capaz de identificar mosaicismos a pesar de su baja frecuencia debido a su mayor sensibilidad (27). La única limitación serían las secuencias pobremente o erróneamente mapeadas, a causa de repeticiones o un elevado nivel de citosina-guanina en determinadas secuencias (27).

Si tenemos en cuenta el hecho de que el cáncer suele deberse a mutaciones somáticas, podríamos afirmar que su génesis está precisamente en las alteraciones genéticas (27,28). El uso de NGS permite estudiar los genomas neoplásicos en su totalidad y detectar que alteraciones suelen manifestar, así como el significado de estas (27,28). Por tanto, ha contribuido a la caracterización molecular de las neoplasias hematológicas, y nos ha permitido conocer datos que desconocíamos sobre la patogenia y evolución de estas patologías (4). Hoy sabemos que al menos del 80% de los pacientes con SMD o LMMoC poseen mutaciones recurrentes, y el conocimiento de estas nos permite una mejor clasificación y valoración del riesgo de los pacientes (4).

A pesar de sus ventajas, su uso aún no ha sido estandarizado en la clínica de manera rutinaria, pero muchos laboratorios ya la emplean a fin de personalizar el diagnóstico, pronóstico o tratamiento de estas entidades (4).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La aproximación más tradicional al diagnóstico y la caracterización de las neoplasias hematológicas incluye el uso de las técnicas de citogenética, la FISH (hibridación fluorescente in situ) y los estudios moleculares de determinados genes de manera aislada y específica (29). Todas estas técnicas son complementarias entre sí, no excluyentes, y aportan información a distintos niveles, tanto con orientación diagnóstica como pronóstica (29).

Sin embargo, en los últimos años diversas mutaciones han sido identificadas en pacientes con SMD, y las implicaciones clínicas de las mismas son diversas dada la heterogeneidad de este grupo de patologías, aunque parece evidente que poseen influencia en el desarrollo de ellas así como en el futuro de los pacientes que las padecen (9). Hoy sabemos que la mayoría de los pacientes que son diagnosticados muestran diferentes mutaciones, incluso aquellos es los que los estudios de citogenética han ofrecido resultados previos sin alteraciones (9).

Por tanto, nos encontramos ante una situación ante la cual necesitamos obtener un perfil detallado desde el punto de vista molecular en el estudio del cáncer, a fin de optimizar el abordaje de cada paciente (29).

El uso de tecnologías de secuenciación de nueva generación o secuenciación masiva (NGS) nos ha permitido profundizar en nuestros conocimientos de la biología tumoral y en las características propias de cada neoplasia, algo esencial debido a la enorme complejidad que revisten (29).

Uno de los pilares esenciales de la oncología en la llamada “medicina de precisión” es asegurar la identificación en cada paciente de las alteraciones genéticas de las que depende el origen o al menos la progresión de su enfermedad y con ellas orientar el tratamiento de cada enfermo de forma individualizada y personalizada (30).

El objetivo de nuestro trabajo será integrar la información que nos permite obtener el estudio de mutaciones realizado por técnicas de secuenciación masiva (NGS) y ponerla en relación con las técnicas de citogenética tradicionalmente empleadas, a fin de establecer cuáles son las implicaciones que dicha información alberga en el diagnóstico, en el tratamiento y en el pronóstico de los pacientes con síndromes mielodisplásicos (y con el grupo de síndromes mielodisplásicos/neoplasias mieloproliferativas).

Comprobaremos también cuáles son las mutaciones más frecuentemente detectadas en los análisis génicos y cuál es el significado que estas poseen y ha sido ampliamente descrito en la literatura médica, tanto en la elección de los tratamientos más adecuados como en la

identificación y control de los casos más agresivos y con mayor posibilidad de transformación en leucemia mieloide aguda, e incluso en el establecimiento de un diagnóstico preciso en casos complejos.

Buscamos, por tanto, ilustrar cómo la detección de determinadas alteraciones génicas puede permitir un mayor conocimiento de los procesos mielodisplásicos y cuál será su utilidad en el campo de la hematología clínica una vez que el uso de estas técnicas se haya generalizado en la mayoría de los hospitales.

3. METODOLOGÍA

Para la elaboración de este trabajo se ha realizado el análisis de una cohorte de un total de 15 sujetos anonimizados de ambos sexos, a los que se había realizado previamente estudios de citogenética (cariotipo y FISH) y que posteriormente fueron sometidos a un estudio de mutaciones realizado mediante procedimientos de secuenciación masiva (NGS o Secuenciación de Nueva Generación).

Se analizaron un total de 15 muestras. Los criterios de selección empleados para la inclusión de los sujetos en el estudio fueron: la realización previa de ambas técnicas de citogenética (cariotipo y FISH) así como de NGS, una sospecha diagnóstica de síndrome mielodisplásico y una edad mayor de 18 años (puesto que no es el objetivo de este estudio abordar mutaciones en línea germinal o síndromes mielodisplásicos de la edad pediátrica, aunque alguno de ellos haya sido citado en la clasificación de la OMS de neoplasias mieloides). Los sujetos examinados pertenecían al área sanitaria de Santiago de Compostela.

Hubo dos sujetos en los cuáles se realizó con anterioridad el análisis empleando técnicas NGS que los de citogenética, si bien todos ellos fueron realizados en cercanía temporal.

A la hora de realizar la **FISH** se lleva a cabo un cultivo celular adaptado al tipo de muestra, orientación diagnóstica y momento de la patología, que permita la obtención de células en mitosis. Tanto las células en interfase como los cromosomas metafásicos resultantes son analizados por técnicas de citogenética molecular mediante hibridación in situ fluorescente utilizando sondas comerciales específicas para la región de interés. El número mínimo de células analizadas es de 100 para sondas de locus específico y centroméricas, y de 20 metafases para librerías.

Respecto al **Cariotipo**, también se lleva a cabo un cultivo celular adaptado al tipo de muestra, orientación diagnóstica y momento de la patología, que permita la obtención de células en mitosis. Los cromosomas metafásicos resultantes son analizados por técnicas de citogenética convencional tras obtener un patrón de bandas G mediante la tinción con el Colorante de Wright. El cariotipo observado se describe a partir del análisis de al menos 20 metafases de acuerdo al ISCN (International System for human Cytogenetic Nomenclature). El tiempo de cultivo es de 24 a 72 horas.

Las muestras empleadas para la realización del análisis génico correspondían a médula ósea de los distintos pacientes con la excepción de tres casos en los cuáles el análisis fue realizado en muestras de sangre periférica (en uno de ellos no se realizó envío de muestra de médula ósea para su análisis y el motivo de este hecho es desconocido).

Para la realización del estudio con el panel de genes se precisa la realización de la extracción del ADN de cada muestra, para posteriormente ser analizado. Dicho ADN se extrajo del pellet de células totales (sin separación celular) con un sistema de extracción de ADN automático basado en partículas magnéticas (Chemagen PerkinElmer) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Además, se debe reseñar que en uno de los sujetos se realizó análisis tanto de ADN como de ARN. Probablemente se actuó de esta manera porque la hipótesis diagnóstica sería “SMD/descartar LMA”. En estos casos, se recomienda también realizar el análisis del ARN. Para realizar la extracción del mismo se utilizó el kit mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow (Roche Diagnosis).

El estudio de las mutaciones fue realizado en la plataforma Ion S5 utilizando el panel Oncomine Myeloid Research Assay. Dicho panel incluye los genes consenso definidos en el convenio PETHEMA (Programa Español de Tratamientos en Hematología) y cubre la región codificante y hotspots (ubicaciones en las cuales se ve aumentada la frecuencia de alteraciones) de mutaciones en los 40 genes que son detallados a continuación:

- **Genes en los que se ha examinado la región codificante completa:** *ASXL1, BCOR, CALR, CEBPA, ETV6, EZH2, IKZF1, NF1, PHF6, PRPF8, RB1, RUNX1, SH2B3, STAG2, TET2, TP53* y *ZRSR2*.
- **Genes en los que se ha examinado las regiones de hotspot:** *ABL1, BRAF, CBL, CSF3R, DNMT3A, FLT3, GATA2, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, MPL, MYD88, NPM1, NRAS, PTPN11, SETBP1, SF3B1, SRSF2, U2AF1* y *WT1*.

Para el análisis de las variantes encontradas se ha empleado el software Ion Reporter. Este mismo software emplea filtros para eliminar del análisis realizado las variantes intrónicas (aunque se excluyen de los filtros los sitios de splicing flanqueantes al exón obtenido), las variantes silentes y sin efecto en la proteína final y variantes con elevada frecuencia en la población (MAF>1%) ya que se consideran cambios polimórficos sin relevancia clínica o que al menos esta relevancia aún no ha podido determinarse.

Se ha de tener en cuenta que esta prueba implica una serie de limitaciones: no permite la identificación de translocaciones ni de reordenamientos equilibrados, ni de variaciones en el número de copias (CNV). No se excluyen tampoco variantes en el ADN no codificante, pseudogenes, expansiones repetitivas de trinucleótidos o alteraciones epigenéticas.

Hay ciertas regiones del genoma cuyas características hacen que no sea posible determinar con exactitud los cambios en la secuencia. Además, la presencia de variantes poco frecuentes en la secuencia del ADN podría impedir la obtención de un número suficiente de secuencias amplificadas, dificultando así la obtención de un resultado fiable para tal región del genoma.

Ninguna variante se considera por debajo de 100 lecturas y por tanto, pueden existir variantes reales en la muestra que no se hayan comunicado por estar estas por debajo del umbral de sensibilidad que se ha establecido previamente.

El estudio se ha realizado buscando alteraciones somáticas, de manera que no se han realizado estudios específicos para descartar o confirmar alteraciones germinales o potencialmente hereditarias. La frecuencia alélica mínima reportada para figurar en el estudio es del 5%.

Las mutaciones incluidas en el estudio fueron exclusivamente aquellas descritas como patogénicas o consideradas patogénicas o posiblemente patogénicas por los predictores proteicos *in silico*, por lo que no se han incluido las identificadas como de significado incierto, probablemente benignas o benignas.

Los resultados obtenidos han sido analizados estadísticamente de una forma meramente descriptiva a fin de determinar cuáles eran las mutaciones más habitualmente encontradas en nuestro grupo y cómo se relacionaban con unas u otras de las sospechas diagnósticas conocidas.

También se ha determinado en qué proporción de los casos estudiados el análisis genético realizado por técnicas de NGS permitía obtener datos que constituyeran información complementaria a la ya existente y obtenida por las otras técnicas de biología molecular realizadas, en cuales era la única técnica capaz de detectar alteraciones en casos de citogenética anodina o por el contrario en cuáles no se obtenía ningún resultado positivo con el empleo de esta técnica.

Posteriormente, se detalla la información sobre las diferentes alteraciones que han sido encontradas en el estudio y la relevancia diagnóstica y pronóstica y la influencia terapéutica de las mismas tal y como se ha descrito previamente en la literatura médica, así como las conclusiones que se derivan de ello.

4. RESULTADOS

El estudio fue realizado con un total de 15 sujetos. La edad media del grupo estudiado fue de 75,13 años, siendo la edad mínima 65 años y la del sujeto de mayor edad 83 años. De los pacientes estudiados un 80% eran de sexo masculino y el 20% restante femenino.

De los casos analizados un 40% de ellos obtuvieron resultados positivos en los estudios de citogenética (Cariotipo y FISH), mientras que en un 93,3% de los casos el análisis mediante técnicas de NGS fue capaz de detectar alguna mutación. Por su parte, un 6,7% de los casos obtuvo un resultado negativo en el análisis NGS.

De los casos en los que la citogenética fue positiva, en un 83,3% de los mismos también aportaba información el uso de las técnicas NGS.

La media de mutaciones detectadas a través de NGS por paciente fue de 3 mutaciones, con una desviación típica de 1,89, siendo 0 el número mínimo detectado y 6 el número máximo de mutaciones identificadas en un mismo individuo. Respecto a la cuantificación de las mutaciones, un 6,7% de los sujetos no manifestaban ninguna mutación identificada con tecnología NGS, un 20% poseían una sola mutación y un 73,3% poseían dos o más mutaciones.

PACIENTE	EDAD (AÑOS)	SEXO	CITOGÉNÉTICA	MUTACIONES	SOSPECHA
PACIENTE 1	85	M	NEGATIVA	3	SMD-SA
PACIENTE 2	78	H	NEGATIVA	3	LMMoC
PACIENTE 3	71	H	NEGATIVA	1	Anemia/Diserit.
PACIENTE 4	81	M	POSITIVA	5	SMD-EB-II+SA
PACIENTE 5	82	H	POSITIVA	3	SMD-EB-II+SA
PACIENTE 6	66	H	POSITIVA	0	SMD-del5q
PACIENTE 7	70	H	POSITIVA	4	LMMoC
PACIENTE 8	83	H	NEGATIVA	2	SMD-SA
PACIENTE 9	78	H	POSITIVA	6	SMD-DML-SA
PACIENTE 10	78	H	POSITIVA	1	Anemia/Diserit.
PACIENTE 11	80	H	NEGATIVA	2	LMMoC
PACIENTE 12	66	M	NEGATIVA	5	SMD-EB-II+SA
PACIENTE 13	79	H	NEGATIVA	1	SMD-SA
PACIENTE 14	65	H	NEGATIVA	6	LMMoC
PACIENTE 15	65	H	NEGATIVA	3	LMMoC

Información obtenida en los diferentes sujetos del estudio.

Anemia/Diserit.: diseritropoyesis. **M:** Mujer; **H:** Hombre

En lo que respecta a la sospecha diagnóstica aportada en cada caso, las más habituales fueron Leucemia Mielomonocítica Crónica, Síndrome Mielodisplásico con Exceso de Blastos II y Síndrome Mielodisplásico con Sideroblastos en Anillo, con un 33,3%, un 20% y un 20% de los casos presentándolas respectivamente.

Las otras sospechas diagnósticas corresponden a SMD con delección en el 5q, Síndrome Mielodisplásico con Displasia Multilínea y Sideroblastos en Anillo y Anemia normocítica y normocrómica con características hiporregenerativas y Diseritropoyesis.

MUTACIONES DETECTADAS	PACIENTES CON MUTACIÓN	SOSPECHA DIAGNÓSTICA			FRECUENCIA EN TOTAL
		SMD	LMMoC	ANEMIA	
SF3B1	6	6	0	0	40%
DNMT3A	3	2	0	1	20%
TET2	11	5	5	1	73.3%
SRSF2	3	1	2	0	20%
RUNX1	1	1	0	0	6.7%
BCOR	3	2	1	0	20%
KRAS	1	0	1	0	6.7%
ZRSR2	4	1	3	0	26.7%
CSF3R	1	1	0	0	6.7%
NF1	1	1	0	0	6.7%
SETBP1	1	1	0	0	6.7%
IDH2	1	1	0	0	6.7%
STAG2	1	1	0	0	6.7%
CBL	1	0	1	0	6.7%
ASXL1	1	0	1	0	6.7%

Tabla con las mutaciones identificadas mediante el uso de técnicas NGS y la frecuencia de las mismas respecto al total de individuos.

En total se encontraron mutaciones oncogénicas en 15 genes. La mutación más frecuentemente identificada en los sujetos del estudio es la que corresponde al gen **TET2**, que se evidencia en un 73,3% de los sujetos.

La siguiente que ha sido más identificada es la mutación en **SF3B1**, que se puede encontrar en un 40% de los sujetos analizados. La siguen la mutación en **ZRSR2**, con un 26,7% de los casos y **DNMT3A**, **SRSF2** y **BCOR**, ambas con un 20% de frecuencia. El resto de mutaciones aparecen con una frecuencia más baja (6,7% de los casos) y aparecen enumeradas en la tabla que se encuentra sobre estas líneas.

También se ha realizado una división de las mutaciones en función de si han sido identificadas en individuos con SMD, LMMoC o en situaciones de Anemia hiporregenerativa/Diseritropoyesis, para facilitar su análisis en el apartado de discusión.

5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Tal y como hemos mencionado previamente, la evaluación diagnóstica de los pacientes con SMD es compleja, y requiere de la realización de multitud de pruebas, que abarcan desde la extensión de sangre periférica o frotis al estudio de la médula ósea y el uso de técnicas de citogenética (31).

Si bien es cierto que a día de hoy los criterios diagnósticos en los SMD y en la LMMoC se basan más en datos morfológicos de displasia y alteraciones cuantitativas (1), los avances en patología molecular y técnicas de secuenciación génica nos han permitido conocer con más detalle estas entidades y plantearnos cuál es el papel que esta información ha de jugar no sólo en el diagnóstico sino también en el manejo de los pacientes (31).

El uso de NGS tiene potencial para ser muy útil a pesar de no haberse estandarizado aún más allá de en los laboratorios de investigación (32). Su capacidad para descubrir mutaciones desconocidas y detectar alteraciones en casos en los que no se encuentran alteraciones citogenéticas sugestivas de clonalidad la hacen especialmente atractiva (32).

Por tanto, a pesar de que en su última revisión la OMS consideraba que el papel de la genética sería limitado de momento en el diagnóstico de los SMD (1), hemos querido comprobar de manera práctica qué tipo de información podemos obtener al realizar técnicas de secuenciación masiva (NGS) en pacientes en los cuáles existía la sospecha de SMD o LMMoC. Así, buscábamos determinar la frecuencia de las alteraciones que son más habitualmente encontradas y al mismo tiempo interpretar cuál es el significado de estas mutaciones tal y como ha sido descrito en la literatura médica.

Los sujetos de nuestro estudio poseían una edad media de 75,13 años, algo bastante razonable si tenemos en cuenta que la patología mielodisplásica se asocia por lo general a población de avanzada edad, situándose la edad media al diagnóstico entre los 72 y los 75 años (2), tal y como se ha reseñado previamente.

Mientras que los estudios de citogenética consiguieron obtener resultados positivos en un 40% de los casos, en nuestra muestra un 93,3% de los sujetos analizados presentaron al menos una mutación al realizar el análisis genético con técnicas NGS. Este dato permite comprobar de manera práctica lo que ha sido ampliamente descrito, y es que más de un 80% de los pacientes con SMD manifiestan al menos una alteración genética (4,33).

Además, podemos observar como incluso en los casos en los que la citogenética no es capaz de identificar ningún patrón alterado las técnicas de secuenciación masiva permiten hacerlo. Solamente encontramos un caso en el cual la NGS no arrojó ningún tipo de información, que resulta coincidente con una citogenética y FISH que permiten llegar al diagnóstico de SDM-del5q. En el resto de los casos, los análisis por NGS son capaces de identificar alteraciones, incluso con las técnicas previas de citogenética y secuenciación dirigida negativas.

La mutación más frecuentemente encontrada en nuestro grupo de estudio corresponde al gen *TET2*, con un 73,3% de los sujetos manifestando esta alteración. Se trata de un hallazgo superior a lo que ha sido descrito en SMD, pues en nuestra cohorte un 62,5% de los sujetos con dicha sospecha la manifiestan, así como el 100% de en los que se sugiere LMMoC.

La incidencia de alteraciones en *TET2* varía de un 20-25% a un 45-60% en función de si estas son analizadas en pacientes con SMD o LMMoC (4). Por tanto, en nuestro grupo de estudio, dicha mutación estaría sobrerrepresentada.

SF3B1 se trata del segundo gen mutado más frecuentemente encontrado, con un 40% del total de los sujetos manifestando dicha anomalía (y un 75% de nuestros pacientes con SMD). Su incidencia ha sido descrita en torno al 30% de los sujetos con SMD (4,5), por lo que en nuestro grupo también estaría sobrerrepresentada. Además, se estima que más del 80% de los pacientes que la poseen muestran un fenotipo con sideroblastos en anillo (4), apareciendo estos en el total de los sujetos de nuestra cohorte con dicha alteración. Sin embargo, un 85,8% de los casos con SA poseían mutación en *SF3B1*, por lo que la presencia de sideroblastos no tiene por qué implicar necesariamente existencia de alteración en este gen.

Las mutaciones en *ZRSR2* son las terceras en frecuencia en nuestro estudio, con un 26,7% de los casos manifestándolas. Hemos encontrado una incidencia del 12,5% en SMD y del 60% en LMMoC, en cuyo caso encontraríamos una frecuencia que puede considerarse levemente aumentada en SMD (5-10% de incidencia (4)) y muy elevada en LMMoC (incidencia del 5-10% de los casos (4)).

Tanto las mutaciones en los genes *DNMT3A* y *SRSF2* como *BCOR* muestran una incidencia del 20% en nuestra muestra. Individualizando en función de diagnósticos, observamos una incidencia del 25% en SMD y 0% en LMMoC para *DNMT3A*, 12,5% en SMD y 40% en LMMoC para *SRSF2* y 25% en SMD y 20% en LMMoC en *BCOR*.

Si tenemos en cuenta que las incidencias habituales en SMD y en LMMoC son de 12-18% y 2-10% para *DNMT3A*, 10-15% y 30-50% para *SRSF2* y <5% y <5% para *BCOR* (4), podemos apreciar un ligero aumento en la incidencia en SMD y una ausencia para LMMoC en *DNMT3A*, unos valores dentro de la normalidad para ambos grupos de patologías en *SRSF2* y un valor mucho más elevado de lo habitual para ambos trastornos en *BCOR*.

Si bien analizaremos el significado de todas las mutaciones, no nos detendremos a comentar mucho más sobre la incidencia de las que no han sido mencionadas previamente, puesto que su incidencia en nuestra muestra es idéntica al haberse detectado solamente en un caso, seguramente como resultado de una muestra sesgada por sus reducidas dimensiones.

Los datos anteriores son resumidos a continuación en la siguiente tabla:

MUTACIÓN	I.SMD	I.NORM.	COMP.	I.LMMOC	I.NORM	COMP.
TET2	62,5%	20-25%	↑	100%	45-60%	↑
SF3B1	75%	20-30%	↑	0%	5-10%	↓
ZRSR2	12,5%	5-10%	↑	60%	5-10%	↑
DNMT3A	25%	12-18%	↑	0%	2-10%	↓
SRSF2	12,5%	10-15%	N	40%	30-50%	N
BCOR	25%	<5%	↑	20%	<5%	↑

Tabla resumen comparando incidencias descritas y las de nuestra muestra (4)

I.SMD: Incidencia hallada en SMD; **I.LMMOC:** Incidencia hallada en LMMoC; **I. NORM:** Incidencia normal; **COMP.:** Comparación entre datos; **N:** Valor entre el intervalo normal; ↑: Valor aumentado; ↓: Valor reducido

La razón que sugerimos como más probable para poder explicar la divergencia de nuestros resultados en lo que a la frecuencia de las mutaciones respecta, contrastándolos con los que figuran en la literatura médica, es el limitado número de pacientes que hemos analizado, con una muestra de solamente 15 pacientes, lo que hace que los valores de incidencia tengan una validez muy reducida en comparación con estudios a gran escala.

Además, se puede incurrir en un sesgo de selección por parte de los hematólogos solicitantes de los estudios al no tratarse la NGS de una prueba estandarizada y de uso habitual en la práctica clínica, por lo que solamente se hace a pacientes en las que otras pruebas no han sido suficientes.

Parece también oportuno y necesario remarcar que si bien buscábamos determinar cuál era la frecuencia de las mutaciones más frecuentemente detectadas, el principal objetivo de este trabajo radica en analizar cuál es el significado que estas alteraciones pueden poseer a fin de determinar qué información aportan las técnicas de secuenciación masiva NGS.

Al revisar las mutaciones que han sido más detectadas (y excluyendo aquellas en las que solamente se ha identificado un caso), encontramos que un 43,3% de los casos corresponde a mutaciones que se asocian a splicing factors (*SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2*), un 46,7% corresponden a reguladores epigenéticos asociados con enzimas de metilación (*DNMT3A*, *TET2*) y un 10% a factores de modificación de histonas (*BCOR*).

Estos hallazgos se corresponden de una manera bastante similar con los resultados de la mayoría de los estudios, en los cuales se tiende a establecer que el grupo de mutaciones que se corresponde con la maquinaria de splicing del ARN son las más frecuentes en SMD (4), correspondiendo el segundo lugar a los reguladores epigenéticos (4), en concreto a las enzimas de metilación y a los componentes del complejo modificador de histonas (31).

En lo que respecta a la correlación directa entre fenotipo y mutación, el único caso en el que se evidencia una clara asociación en nuestros sujetos es en la alteración en el gen *SF3B1*, puesto que en todos los casos en los que se puede detectar encontramos también la existencia de sideroblastos en anillo en el análisis morfológico de la médula ósea.

El resto de mutaciones detectadas, pese a tener algún significado, no se han asociado de manera específica a algún rasgo fenotípico característico.

Por lo que hemos visto, el fenotipo de los sujetos empeora con la ganancia de nuevas mutaciones, siendo los pacientes en los que hemos detectado más de 3 mutaciones los que poseían fenotipos clínicos más agresivos como SMD-EB-II o LMMoC con transformación a LMA.

El empeoramiento del pronóstico de los pacientes a nivel que aumenta el número de mutaciones que son detectadas en los análisis NGS ha sido establecido, y del mismo modo, se considera que no todas las mutaciones tienen el mismo valor pronóstico (mutaciones en *FLT3* o en *RAS* predicen una transformación a LMA muy rápida una vez que son detectadas, por ejemplo) (31).

Un dato interesante y a tener en cuenta es que el valor pronóstico y por tanto la influencia que tienen las mutaciones en el desarrollo de estas patologías parece no variar en función de su momento de aparición, más tardío o más temprano, en el curso de la enfermedad (31).

5.1 MUTACIONES EN SMD

Entre el 80 y el 90% de los pacientes con SMD y el 90% de los pacientes con LMMoC albergan mutaciones que pueden ser identificadas mediante técnicas de secuenciación masiva NGS (32). Se conocen más de 50 genes que se encuentran mutados de manera recurrente en pacientes con mielodisplasia (33). Aunque se han propuesto multitud de modelos que tienen en cuenta los resultados obtenidos en los análisis de las mutaciones de cara a estratificar el pronóstico de los pacientes con SMD, la OMS aún no ha reconocido ninguno ni recomienda su uso sistemático (32).

Diversos genes que han sido identificados en pacientes con SMD han sido estudiados y se ha establecido su influencia de cara al diagnóstico, pronóstico y manejo terapéutico de los

mismos (32). Además, la identificación de estas mutaciones nos brinda la oportunidad de profundizar en la investigación fisiopatogénica de las neoplasias mieloides (32).

Las principales categorías de genes que se ven implicadas en los procesos celulares de los pacientes con SMD son las siguientes:

“Maquinaria de Splicing del ARN (64%): *SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *U2AF1*, *U2AF2*; **Metilación del ADN** (45%): *TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*; **Modificaciones de la cromatina** (27%): *ASXL1*, *EZH2*; **Factores de transcripción** (15%): *TP53*, *RUNX1*, *ETV1*, *GATA2*; **Vías de traducción de señales** (15%): *FLT3*, *JAK2*, *MPL*, *GNAS*, *KIT*; **Vía RAS** (12%): *KRAS*, *NRAS*, *CBL*, *NF1*, *PTPN11*; **Complejos de cohesinas** (13%): *STAG2*, *CTCF*, *SMC1A*, *RAD21* y **Genes de reparación del ADN** (10%): *ATM*, *BRCC3*, *DLRE1C*, *FANCL*”(34).

Esta clasificación superior, mucho más extensa, puede resumirse en que los genes más frecuentemente afectados son aquellos que implican procesos de splicing ARN (como *SRSF2*, *SF3B1* o *ZRSR2*), metilación del ADN (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*) y genes que intervienen en la proliferación de células mieloides y en cómo estas se diferencian (*ASXL1* o *RUNX1*) (33). Por su parte, las alteraciones en vías que tienen que ver con activaciones de tirosina kinasa son poco habituales en SMD, a diferencia de en otro tipo de neoplasias (33).

Algunas mutaciones como las de *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1* o *ASXL1* se consideran factores predictores de una corta supervivencia con independencia de otros marcadores, mientras que por su parte, la mutación aislada en *SF3B1* suele considerarse un signo de buen pronóstico y se asocia a una elevada esperanza de vida en comparación con otros SMD (32).

Para simplificar el análisis de las diferentes mutaciones que hemos encontrado, comentaremos de una manera más detallada las mutaciones más frecuentemente identificadas en nuestra cohorte (*SF3B1*, *TET2*, *ZRSR2*, *SRSF2*, *DNMT3A* y *BCOR*) y luego mencionaremos de forma resumida las características más importantes del resto.

5.1.1 FACTORES DE SPLICING

El complejo de factores de splicing está compuesto por proteínas que se encuentran implicadas en la eliminación de los intrones en el proceso de maduración del ARNm inicial con el fin de obtener ARNm maduro, que consiste solamente en la parte que se va a traducir a proteínas o exoma (31,34).

El spliceosoma puede definirse como una macromolécula formada por 5 pequeños ARN nucleares asociados a proteínas (12). Sus mutaciones son muy poco frecuentes en cáncer pediátrico, por lo que se supone que se trata de una mutación adquirida con la edad (12).

De manera teórica, podríamos suponer que las mutaciones en los factores que forman parte de este complejo darían lugar a un proceso de splicing incorrecto, ya sea por retención de intrones o alteración en las regiones que deben ser reconocidas (35). Aunque esto no haya sido totalmente confirmado y no se hayan descrito de manera fehaciente los mecanismos fisiopatogénicos que llevan a estas mutaciones a inducir clonalidad, se asume que un splicing incorrectamente realizado podría tener consecuencia similares a las mutaciones de pérdida de función, a causa de la retención de los intrones (35), o por el contrario una ganancia o cambio de función en un splicing alternativo (24,34).

En cualquier caso, parece evidente que las alteraciones en el spliceosoma darían lugar a alteraciones en ARNm que codifican proteínas implicadas en transformación maligna (35).

La mayoría de las mutaciones detectadas tienden a aparecer en heterocigosis, por lo que se presupone que la presencia de mutaciones en ambos alelos (homocigosis) podría conducir a muerte celular (31,35). Esto implicaría que haya una pérdida o ganancia de función, esta no sería tolerable, dando lugar a una situación en la que no sería suficiente para ser compatible con la vida celular (31,35).

Las mutaciones que afectan a los factores de splicing han sido denominadas en algunas ocasiones como mutaciones “específicas de SMD”, puesto que su incidencia es rara en LMA o NMP y su expresión fenotípica tiende a corresponderse con mielodisplasia (34).

5.1.1.1 MUTACIONES EN *SF3B1*

Las mutaciones en *SF3B1* se identifican con una frecuencia muy elevada en pacientes con síndrome mielodisplásico con sideroblastos en anillo, aunque también pueden aparecer en otros tipos de SMD o SMD/NMP, siendo esta menor (36). Se ha descrito que esta mutación posee un valor predictivo de presentación fenotípica con sideroblastos en anillo del 97,7%, lo que establece una estrecha asociación entre estos datos (36). De hecho, en los pacientes analizados en nuestra cohorte se identificaron sideroblastos en anillos en el 100% de los casos en los que aparecía esta mutación.

No obstante también se han descrito otras mutaciones distintas asociadas a la aparición de sideroblastos en anillo (36) y en nuestra cohorte encontramos un caso de un paciente que presenta sideroblastos en anillo sin alteración en *SF3B1*.

Los sideroblastos en anillo pueden apreciarse con tinciones específicas para hierro (Perls) en las médulas óseas de estos pacientes como células eritroides en diferenciación, con un anillo de mitocondrias cargadas de hierro rodeando al núcleo, de donde deriva su nombre (37).

Las mutaciones en *SF3B1* no parecen ser demasiado agresivas fenotípicamente, por lo que se postula que a pesar de dicha alteración, la proteína resultante aún puede realizar sus funciones de manera parcial (37).

Se ha visto que los SMD con *SF3B1* mutado manifiestan cifras más elevadas de neutrófilos y plaquetas y al mismo tiempo cifras más bajas de células blásticas en médula ósea que los que carecen de dicha mutación, siendo todo ello signos de buen pronóstico (37). Incluso en aquellos pacientes con displasia multilínea, la presencia de *SF3B1* mutado se asocia a una menor displasia y citopenias (36). Además, esta mutación actúa como factor protector de la evolución a LMA al reducir el riesgo de progresión a dicha entidad (36).

SF3B1 define un subtipo de SMD con rasgos bastantes similares y pronóstico favorable en aquellos pacientes con SMD-SA, mientras que estas características son más heterogéneas y la evolución es peor en los casos en que no se encuentra mutado (36,38). El fenotipo que encontramos es claro: displasia eritroide aislada y una proporción elevada de sideroblastos en anillo en médula (36). Además, se sabe que los pacientes con esta mutación suelen manifestar una hematopoyesis inefectiva que conduce a niveles muy bajos de hepcidina y por tanto se favorece la sobrecarga tisular férrica (36).

Sin embargo, a pesar de su valor pronóstico tan positivo, la ganancia de más mutaciones y la aparición de un exceso de blastos empeoran significativamente el curso de los pacientes que poseen *SF3B1* alterado, por lo que se considera que dicho efecto protector se acaba viendo sobrepasado con la evolución de la enfermedad y en los casos en que la mutación coexiste con otras de mal pronóstico (36).

Finalmente parece oportuno mencionar que las mutaciones en *SF3B1* parecen ser excluyentes con las de *TP53*, mucho más habituales en SMD-SA con *SF3B1* sin mutar y de muy mal pronóstico (36).

5.1.1.2 MUTACIONES EN *ZRSR2*

ZRSR2 es un gen que forma parte también del complejo de proteínas que conforma el spliceosoma, y su expresión corresponde de una proteína heterodimérica que se conoce como “*U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35 kDa subunit-related protein 2*”(39). Las mutaciones son más frecuentes en pacientes con SMD y neutropenia aislada (34).

ZRSR2 no se ha asociado con la presencia de sideroblastos en anillo, a diferencia de *SF3B1*, y se trata de una mutación que podemos ver en diversos tipos de SMD sin una asociación clara a nivel fenotípico o anomalías citogenéticas (39).

La presentación en un mismo individuo de esta mutación con las de *TET2* ha sido descrita en varios sujetos (34). En nuestra cohorte, en todos los pacientes que manifestaban mutación en *ZRSR2* se ha identificado también coexistencia con mutaciones en *TET2*.

Las alteraciones en *ZRSR2* han sido descritas como de pronóstico desfavorable en SMD y de significado indeterminado en LMMoC (4).

5.1.1.3 MUTACIONES EN *SRSF2*

Las mutaciones en *SRSF2* son especialmente habituales en LMMoC y su incidencia es mayor que en los SMD, y se asocian a monocitosis y marcada trombocitopenia (4,34). En SMD, suele evidenciarse displasia multilínea y exceso de blastos, con tendencia a progresar a leucemia (12).

Se observan con mayor frecuencia en individuos de sexo masculino (los 3 sujetos que portaban esta mutación en nuestro sujeto eran varones), de avanzada edad y en coexistencia con otras alteraciones en genes como *RUNX1* (un gen que corresponde a un factor de transcripción), *IDH1* (una enzima participante en el ciclo del ácido cítrico) o *ASXL1* (34).

Tanto en LMMoC como en SMD, la asociación más habitual de *SRSF2* es con las alteraciones en *TET2* (24,34), implicando esta coexistencia un riesgo mayor de transformación en LMA (34). Todos los sujetos de nuestra cohorte en los que la NGS detectó mutaciones en *SRSF2* poseían también mutaciones en *TET2*. Además, la coexistencia de alteraciones en *SRSF2* y *TET2* se asocia a fenotipos con presencia de rasgos mieloproliferativos, displasia y monocitosis (38).

El pronóstico de los pacientes con *SRSF2* mutado suele ser oscuro y con implicaciones bastante negativas (34,39). La supervivencia es menor que la de los que no lo tienen mutado y se ve un marcado aumento en la progresión a LMA, incluso en los pacientes que manifiestan SDM que son estratificados como de bajo riesgo (39). Si realizamos una comparación con los pacientes con *SF3B1* mutado, observamos que si bien en ambos casos encontramos presencia de sideroblastos en anillo, la supervivencia media libre de leucemia puede ser mayor de 10 años en el primer caso y menos de 2 en los que poseen la mutación en *SRSF2* (12).

SRSF2 también participa en los procesos de control y regulación del ADN, por lo que sus alteraciones implican cierta inestabilidad genómica y por tanto un fenotipo más agresivo y maligno (39).

5.1.2 REGULADORES EPIGENÉTICOS

De forma general, se considera que son las segundas alteraciones más frecuentes en mielodisplasia (31). La diferenciación de las células y su maduración es un proceso epigenético que requiere de una ordenada metilación del ADN y de mecanismos específicos de regulación de histonas o modificaciones en la cromatina (12).

Las alteraciones en las islas Citosina-Guanina de los promotores génicos afectan a uno de los principales mecanismos de control transcripcional y se ven implicadas en la génesis de multitud de procesos tumorales, entre ellos neoplasias hematológicas (34). Por tanto, si se afectan las enzimas que realizan la metilación del ADN se va a condicionar la expresión de multitud de genes, que será anómala (34).

DNMT3A o *TET2* son genes que participan en la regulación de los procesos de metilación y que pueden encontrarse mutados en SMD o LMMoC (31,34). En los SMD, las mutaciones en estos genes suelen llevar a hipermetilación de otros genes cuya función radica en el control de la proliferación, de la adhesión tisular, y a modificaciones patológicas de los precursores hematopoyéticos (34).

5.1.2.1 MUTACIONES EN *TET2*

Las mutaciones en *TET2* han sido las que hemos encontrado en un mayor número de sujetos en nuestro grupo de investigación. La familia de enzimas TET catalizan una reacción de oxidación sobre la 5-metilcitosina para dar origen a 5-hidroximetilcitosina, en una reacción enzimática dependiente de cetoglutarato (5). Cuando *TET2* se ve alterada, las consecuencias suelen implicar una pérdida de función, por la cual esta reacción no es catalizada de manera adecuada y se acumula el metabolito inicial, la 5-metilcitosina (5).

La actividad de *TET2* se ve afectada también por otros genes de este mismo grupo, *IDH* (isocitrato deshidrogenasas) 1 y 2, que dan lugar a la aparición de 2-hidroxiglutarato, un producto oncogénico que inhibe la función de múltiples enzimas como *TET2* (31).

Las mutaciones en *TET2* se asocian a edad avanzada, hematopoyesis clonal y cariotipos normales (34). Tampoco se ha establecido una clara relación entre las alteraciones en *TET2* y determinadas manifestaciones clínicas como citopenias o aumento en el número de blastos (40). Como se ha dicho previamente, la asociación de *TET2* y *SRSF2* es muy habitual en LMMoC y suele implicar un importante riesgo de transformación leucémica (34). No obstante, no se atribuye un valor pronóstico concreto a las mutaciones en *TET2*, aunque en SMD parece encontrarse una mayor respuesta a agentes hipometilantes (4,12).

Los pacientes con *TET2* mutado manifiestan un 82% de respuesta a la Azacitidina mientras que solamente lo hace un 45% de los no poseen la mutación, aunque no está claro si esta respuesta aumenta la supervivencia o la duración de dicha respuesta (9,41).

5.1.2.2 MUTACIONES EN *DNMT3A*

DNMT3A se corresponde con una metiltransferasa del ADN, y se encarga de catalizar la transferencia de grupos metilo a citosinas en las islas Citosina-Guanina del ADN (34). Las mutaciones, por lo general, llevan a una pérdida de función, y se altera el mantenimiento de la metilación en diversas regiones cromosómicas, silenciándose genes que permiten el control de la reproducción celular (34).

Las alteraciones en *DNMT3A* no siempre implican la definición de SMD cuando aparecen de manera aislada (uno de los sujetos de nuestro estudio solamente manifestaba anemia hiporregenerativa con algunos signos de clonalidad pero no se podía hacer el diagnóstico de SMD), pero en SMD se asocian a un pronóstico muy poco favorable y una elevada progresión a LMA (4). Aparecen también en las LMA *de novo* y condicionan una evolución bastante precaria (12).

Se ha visto que su coexistencia con *SF3B1* implica un curso algo menos agresivo, por lo que *SF3B1* mitigaría el efecto de dicha mutación (12).

5.1.3 MUTACIONES EN F. MODIFICIACIÓN DE HISTONAS

El control epigenético de las modificaciones postraduccionales de las proteínas histónicas, a través de reacciones de acetilación, metilación o ubiquitinación, es llevado a cabo por un grupo de enzimas que actúan como factores modificadores de las histonas (34). En nuestro grupo, encontramos un 20% de los sujetos con una mutación en el gen *BCOR*, y es por tanto en el que nos vamos a centrar en este apartado.

El gen *BCOR* se ubica en el brazo corto del cromosoma X y codifica un correpresor de BCL6, un represor transcripcional que es necesario en el centro germinal de los ganglios para el correcto desarrollo de los linfocitos y que se hipotetiza que podría tener alguna función en la apoptosis (12,42). También interactúa con las deacetilasas histónicas (43).

Su inactivación ha sido descrita en LMA, Leucemia Promielocítica (42) y también en SMD (12,43). Se trata de mutaciones subclonales, que aparecen con la enfermedad avanzada y por tanto no afectan todas las líneas derivadas de la misma clona (12), es decir, estamos ante mutaciones que no han sido relacionadas con la oncogénesis hematológica en etapas iniciales pero que sí tienen una marcada influencia en el desenlace de estos enfermos (42).

Los pacientes en los cuales hemos encontrado mutaciones en *BCOR* poseían al menos otras cuatro mutaciones distintas y sus fenotipos eran bastante agresivos, SMD-EB-II o LMMoC en transformación. Estos hallazgos coinciden con la información de la que se dispone, puesto que el pronóstico de los pacientes empeora al aparecer esta mutación y aumenta considerablemente su riesgo de evolución a LMA (42,43).

5.1.4 OTRAS MUTACIONES

Además de las que han sido mencionadas, en nuestro estudio encontramos otras mutaciones, que si bien aparecían con una incidencia mucho menor (6,7% de los sujetos estudiados), también han sido descritas previamente y estudiadas a fin de determinar la información que nos pueden aportar.

Expondremos estos datos deteniéndonos en cada una de ellas brevemente:

- ***RUNX1***. Las mutaciones suelen traducirse en una pérdida de función en un gen que actúa como factor transcripcional nuclear (4). Se asocia con una clara trombocitopenia (40) y monosomía o delección de 7q y el pronóstico es bastante malo (34). Podemos encontrarla en SMD de alto riesgo o en transformación a LMA (4). *RUNX1* además puede afectar a la línea germinal y ser responsable de síndromes hereditarios que pueden derivar en SMD (31).
- ***KRAS***. La superfamilia RAS abarca múltiples factores de transcripción (12). Mientras que en SMD, su significado aún es desconocido, las mutaciones en *KRAS* son desfavorables en LMMoC e indicativas de progresión a LMA (4).
- ***CSF3R***. Corresponde al receptor para el factor estimulante de colonias 3. Se ha asociado a evolución a SMD o LMA en pacientes con neutropenia congénita y muy directamente con la aparición de leucemia neutrofílica crónica (12).
- ***NF1***. Factor de transcripción de señales que al encontrarse mutado puede desencadenar una serie de eventos que conducen a la progresión a LMA (4).
- ***SETBP1***. Regulador de la proteína nuclear SET, actúa como oncogén induciendo la proliferación similar cuando se encuentra mutado y se asocia a un muy mal pronóstico cuando coexiste con alteraciones cariotípicas (34). Tiende a aparecer en el proceso de leucemización (riesgo muy aumentado de progresión a LMA) e implica reducida supervivencia general (12).
- ***IDH2***. La isocitrato deshidrogenasa cataliza la conversión de isocitrato en cetoglutarato, que interviene en la regulación de *TET2* (34). Cuando está mutado este gen, facilita la aparición de 2-hidroxiglutarato, que inhibe la función de *TET2* y facilita la hipermetilación de genes de control celular (34). Manifiesta exclusión con las alteraciones en *TET2* y se asocia a un mal pronóstico y evolución a LMA (34).
- ***STAG2***. El complejo multiproteico de cohesinas actúa en el mantenimiento de las cromátidas en los sistemas de reparación postreplicación del ADN, y los genes *STAG* forman parte de él (4). Aunque sus alteraciones no den lugar a marcadas aneuploidías (31), si se asocian a fenotipos con displasia multilínea y exceso de blastos así como a una reducida supervivencia (4).
- ***CBL***. Se trata de una alteración muy poco habitual, en una ubiquitina ligasa asociada a tirosina-kinasa (34). Se suele detectar en LMMoC y se asocia a reducida supervivencia por la progresión a LMA (4,34).
- ***ASXL1***. Codifica una proteína de unión a la cromatina que participa en los mecanismos de remodelado y mantenimiento de la misma (34). Además, se baraja su posible función

como gen supresor de tumores (44). Tiende a aparecer en SMD o LMMoC en progresión y estadios avanzados y se asocia a cariotipos normales (44). *ASXL1* sirve como marcador pronóstico independiente de otras variables (edad, sexo o número de células blásticas) de pronóstico aciago y reducida supervivencia con evolución a LMA (4,44)

5.2 MUTACIONES EN LMMOC

En la LMMoC los factores que pueden predecir el curso de la enfermedad no han podido ser desentrañados, por lo que nos apoyamos básicamente en parámetros analíticos como la anemia o el nivel de monocitosis, e incluso clínicos, como la esplenomegalia (45). Sin embargo, los avances en técnicas de secuenciación masiva han permitido que obtengamos un conocimiento mayor acerca de las características moleculares de esta patología y poder comprender mejor las rutas fisiopatogénicas que se derivan de las distintas mutaciones (45).

A pesar de la diversidad de mutaciones que podemos encontrar cuando utilizamos técnicas de NGS en LMMoC, y que no hay ninguna que sea específica de esta patología, sí conocemos varias que son más frecuentes que en otras, como las alteraciones en *TET2* o *SRSF2*, que aparecen en más de un 40% de los pacientes (24). En los sujetos de nuestra cohorte con esta sospecha diagnóstica, encontramos una sobrerrepresentación de *TET2* y unos valores dentro de la normalidad para *SRSF2*.

Las mutaciones en *TET2* son las más habituales en esta entidad y varios datos apuntan a que estaría detrás del inicio de la cascada de reacciones que origina la aparición de clonalidad (24). Alteraciones en *TET2* e incluso en *CBL* (si se haya presente, dado que su incidencia suelen ser baja) suelen encontrarse en la mayoría de células de estos sujetos, lo que indicaría que son mutaciones que aparecen en estadios iniciales, previo a que el clon derivado ocupe en un porcentaje muy elevado la médula ósea (45). Como ya se ha dicho, se ha sugerido que el uso de agentes hipometilantes podría mejorar el pronóstico de los pacientes con esta alteración (24).

Por su parte, del grupo de enzimas modificadoras histonas, *ASXL1* es el gen que más frecuentemente se ve alterado, con un curso muy agresivo de la enfermedad en dichos casos.

5.3 MUTACIONES EN CITOPENIAS/ENVEJECIMIENTO

Los estudios de secuenciación del exoma han revelado que la hematopoyesis clonal es algo mucho más frecuente de lo que se pensaba, y que aumenta con la edad alcanzando valores cercanos al 20% en los pacientes mayores de 90 años (46). El incremento de estos estados es similar al que existe con otras situaciones que pueden dar lugar a neoplasias

hematológicas como son la MGUS con el Mieloma Múltiple o la Linfocitosis monoclonal con los Linfomas (20).

Se ha de tener en cuenta que aunque las técnicas de secuenciación génica pueden facilitar nuestro trabajo diagnóstico, no se puede caer en el error de realizar un diagnóstico de SMD ante la ausencia de evidencia clínica o anatomopatológica, solamente apoyándonos en la identificación de mutaciones (32).

La incidencia de mutaciones en los precursores hematopoyéticos de la población sana se eleva con la edad, siendo *DNMT3A*, *TET2*, *TP53*, *JAK2* y *ASXL1* los genes más frecuentemente detectados, que aumentan el riesgo de desarrollar neoplasias hematológicas al establecer una situación de hematopoyesis clonal o **CHIP** (14,32). Estas mutaciones otorgan ciertas ventajas selectivas a los precursores hematopoyéticos pero permiten que se puedan seguir diferenciando en las distintas líneas celulares, haciendo que este proceso sea generalmente asintomático (4). En nuestra cohorte, encontramos dos sujetos, con una alteración aislada en *DNMT3A* en uno de ellos y otra en *TET2* en el otro, en los que solamente se ha podido evidenciar de manera clínica cierta anemia hiporregenerativa.

Los genes que participan en la regulación epigenética son los más que más habitualmente se ven alterados en estas situaciones de hematopoyesis clonal, y al mismo tiempo se consideran básicos en la patogenia y el desarrollo de los SMD (31). Las mutaciones en *TET2* en SMD tienden a asociarse con individuos de avanzada edad, cariotipos normales y hematopoyesis clonal, lo que sugiere la idea de que las mutaciones de *TET2* pueden ser un factor asociado con el envejecimiento, que provoca leves alteraciones en los precursores hematopoyéticos (34).

No podemos olvidar que el cáncer es una enfermedad que se desarrolla con el paso de años y la adquisición de mutaciones consecutivas que alteran el funcionamiento celular, por lo que la detección de estas mutaciones en individuos sanos refleja cierta clonalidad, pero no malignidad (32). Dado el bajo porcentaje de pacientes que evolucionan de **CHIP** a SMD, muchos más eventos deben tener lugar para conseguir esa progresión (31).

Por otra parte, si comparamos **CHIP** con las situaciones de **CCUS** veremos que los patrones moleculares son diferentes: mientras que *DNMT3A* o *TET2* siguen siendo frecuentes en **CCUS**, en estas entidades encontramos una incidencia mucho mayor de alteraciones en genes que son considerados de mal pronóstico en SMD, como *ASXL1*, *RUNX1* o *TP53* (21). La frecuencia además con la aparecen estas alteraciones génicas no dista mucho de la que se reporta en los SMD (22). En los pacientes con **ICUS** en los que se encuentra alguno de estos últimos genes mutados también se encuentra un riesgo de progresión mucho mayor que si no aparecen (21).

5.4 MUTACIONES Y TRASPLANTE

El único tratamiento realmente curativo del que disponemos para los pacientes con síndromes mielodisplásicos es el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (TAPH) (47). Se considera su uso en los pacientes que pueden ser candidatos a trasplante por sus características clínicas y la falta de respuesta a otros tratamientos menos agresivos por parte de la enfermedad, con un límite etario de entre 65 y 70 años (47).

Se ha reportado que las mutaciones en *TP53*, *TET2* y *DNMT3A* se asocian a una elevada probabilidad de recaída post-trasplante (47). Posteriormente, se ha visto también que las mutaciones en *ASXL1* o *RUNX1* también eran factores que parecían influenciar de manera independiente un pronóstico aciago en los pacientes sometidos a trasplante (31,47).

Además, se ha observado que en estos pacientes que llegan a necesitar el uso de trasplante es bastante habitual el encontrar un genotipo que es muy sugestivo de clonalidad y evolución a Leucemia Mieloide Aguda: son pacientes en los cuales se reduce la cantidad de mutaciones *SF3B1*, tradicionalmente de buen pronóstico, y en su lugar se elevan enormemente las alteraciones en *RUNX1* o *TP53*, ambas de alto riesgo (47).

6. CONCLUSIONES

1. El 40% de los pacientes analizados habían obtenido resultados positivos para estudios de citogenética. Sin embargo, los análisis NGS arrojaban información detectando al menos una mutación en un 93,3% de los casos, y un 73,3% de los pacientes poseían al menos 2 mutaciones.
2. Las mutaciones más frecuentemente detectadas en SMD y LMMoC implican genes cuya expresión comprende componentes del mecanismo de splicing (*SF3B1*, *ZRSR2*, *SRSF2*) en un 43,3%, reguladores epigenéticos (*TET2* o *DNMT3A*) en un 46,7% y mecanismos de control histónico (*BCOR*) en un 10% de los casos estudiados.
3. Las alteraciones en el gen *TET2* constituyen las más frecuentemente detectadas, siendo positivas en un 73,3% de los pacientes y manifestando en nuestra muestra una frecuencia superior a la descrita en la literatura en SMD y LMMoC. Su presencia se asocia a una mejor respuesta a agentes hipometilantes. Además, se encuentra presente en la totalidad de los pacientes con sospecha de LMMoC por lo que estimamos que podría estar involucrada en la génesis de este trastorno.
4. *SF3B1* es el segundo gen mutado en frecuencia, con un 40% de los casos, y constituye la única alteración identificada con una asociación fenotípica clara, encontrándose sideroblastos en anillo en el estudio de la médula ósea de la totalidad de los sujetos examinados con anomalías en *SF3B1*.
5. *ZRSR2* es el tercer gen mutado más identificado, positivo en un 26,7% de los casos y coexistente en la totalidad de los pacientes analizados con alteraciones en *TET2*, asociándose esta combinación a un pronóstico negativo en SMD e incierto en LMMoC.
6. Las mutaciones en *DNMT3A*, *SRSF2* y *BCOR* se encontraron en un 20% de los sujetos. La afectación en *DNMT3A* no implica presencia de SMD por sí misma y así ha sido identificada en un caso de exclusiva anemia hiporregenerativa, pero si se encuentra en SMD, el pronóstico suele ser negativo.
7. *SRSF2* se asocia a monocitosis y trombocitopenia cuando está mutado y tiende a coexistir con alteraciones en *TET2* (en nuestro estudio, encontramos esta asociación en el total de los casos en los que aparecía mutado). Esta combinación se asocia a una elevada progresión a LMA.

8. Los pacientes en los cuales hemos encontrado mutaciones en *BCOR* poseían al menos otras cuatro mutaciones distintas y sus fenotipos eran bastante agresivos: SMD-EB-II o LMMoC en transformación, por lo que asocia a desenlaces sombríos.
9. Hemos observado que los pacientes analizados manifestaban un fenotipo más agresivo a medida que aumentaba el número de mutaciones que presentaban, asociándose este número a fenotipos con excesos de blastos y situaciones próximas a la transformación a LMA.
10. Los resultados de la investigación pueden encontrarse sesgados a causa del reducido número de pacientes que fue incluido en la realización del estudio. El tamaño muestral no ha podido ser ampliado debido a la limitación de movimiento impuesta por la pandemia COVID-19.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 2016;127:2391–405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544
2. Kennedy AL, Shimamura A. Genetic predisposition to MDS: Clinical features and clonal evolution. *Blood*, 2019;133:1071–85. DOI: 10.1182/blood-2018-10-844662
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 1982;51:189–99.
4. Palomo L, Ibáñez M, Abáigar M, Vázquez I, Álvarez S, Cabezón M, et al. Spanish Guidelines for the use of targeted deep sequencing in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 2020;188:605–22. DOI: 10.1111/bjh.16175
5. Gangat N, Patnaik MM, Tefferi A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *Am J Hematol*, 2016;91:76–89. DOI: 10.1002/ajh.24253
6. Ma X. Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. *Am J Med*, 2012;125:2–5. DOI: 10.1016/j.amjmed.2012.04.014
7. Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST. Myelodysplastic syndromes: Incidence and survival in the United States. *Cancer*, 2007;109:1536–42. DOI: 10.1002/cncr.22570
8. Aul C, Gattermann N, Schneider W. Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 1992;82:358–67. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1992.tb06430.x
9. Greenberg PL, Stone RM, Al-Kali A, Barta SK, Bejar R, Bennett JM, et al. Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017. *J Natl Compr Cancer Netw*, 2017;15:60–87. DOI: 10.6004/jnccn.2017.0007
10. National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review 1975-2016: Myelodysplastic syndromes (MDS), chronic myeloproliferative disorders (CMD), and chronic myelomonocytic leukemia (CMML) [Internet], 2020
11. Greenberg PL, Tuechler H. Revised international prognostic scoring system for MDS. *Blood*, 2012;120:2454–65. DOI: 10.1182/blood-2012-03-420489

12. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood*, 2013;122:4021–34. DOI: 10.1182/blood-2013-09-381665
13. Aul C, Bowen DT, Yoshida Y. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 1998;83:71–86.
14. Malcovati L, Cazzola M. The shadowlands of MDS: idiopathic cytopenias of undetermined significance (ICUS) and clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP). *Hematology*, 2015;2015:299–307. DOI: 10.1182/asheducation-2015.1.299
15. Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K, et al. Clonal Architecture of Secondary Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 2012;366:1090–8. DOI: 10.1056/NEJMoa1106968
16. Bennett JM. Changes in the Updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*, 2016;16:607–9. DOI: 10.1016/j.clml.2016.08.005
17. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 2009;114:937–51. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209262
18. Invernizzi R, Quaglia F, Porta MG Della. Importance of classical morphology in the diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Mediterr J Hematol Infect Dis [Internet]*, 2015;7:e2015035. DOI: 10.4084/MJHID.2015.035
19. Valent P, Bain BJ, Bennett JM, Wimazal F, Sperr WR, Mufti G, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. *Leuk Res*, 2012;36:1–5. DOI: 10.1016/j.leukres.2011.08.016
20. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2015;126:9–16. DOI: 10.1182/blood-2015-03-631747
21. Bejar R. CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. *Leukemia*, 2017;31:1869–71. DOI: 10.1038/leu.2017.181
22. Kwok B, Hall JM, Witte JS, Xu Y, Reddy P, Lin K, et al. MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Blood*, 2015;126:2355–61. DOI: 10.1182/blood-2015-08-667063

23. Orazi A, Germing U. The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. *Leukemia*, 2008;22:1308–19. DOI: 10.1038/leu.2008.119
24. Itzkson R, Fenaux P, Solary E. Chronic myelomonocytic leukemia: Myelodysplastic or myeloproliferative? *Best Pract Res Clin Haematol*, 2013;26:387–400. DOI: 10.1016/j.beha.2013.09.006
25. Morita K, Arai S, Kogure Y, Honda A, Nakazaki K, Kurokawa M. Serum LDH Is Useful to Predict Prognosis for Intermediate-Risk Myelodysplastic Syndrome. *Blood*, 2015;126:5255. DOI: 10.1182/blood.V126.23.5255.5255
26. Delacrétaz F, Schmidt P-M, Piguet D, Bachmann F, Costa J. Histopathology of Myelodysplastic Syndromes: The FAB Classification (Proposals) Applied to Bone Marrow Biopsy. *Am J Clin Pathol*, 1987;87:180–6. DOI: 10.1093/ajcp/87.2.180
27. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 2013;98:236–8. DOI: 10.1136/archdischild-2013-304340
28. Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyzyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*, 2014;30:418–26. DOI: 10.1016/j.tig.2014.07.001
29. Cottrell CE, Al-Kateb H, Bredemeyer AJ, Duncavage EJ, Spencer DH, Abel HJ, et al. Validation of a next-generation sequencing assay for clinical molecular oncology. *J Mol Diagn*, 2014;16:89–105. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2013.10.002
30. Hyman DM, Taylor BS, Baselga J. Implementing Genome-Driven Oncology. *Cell*, 2017;168:584–99. DOI: 10.1016/j.cell.2016.12.015
31. Kennedy JA, Ebert BL. Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. *J Clin Oncol*, 2017;35:968–74. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.0806
32. Reinig E, Yang F, Traer E, Arora R, Brown S, Rattray R, et al. Targeted Next-Generation Sequencing in Myelodysplastic Syndrome and Chronic Myelomonocytic Leukemia Aids Diagnosis in Challenging Cases and Identifies Frequent Spliceosome Mutations in Transformed Acute Myeloid Leukemia. *Am J Clin Pathol*, 2016;145:497–506. DOI: 10.1093/ajcp/aqw016
33. Bräuninger A, Blau W, Kunze K, Desch A-K, Brobeil A, Tur MK, et al. Targeted Next-Generation Sequencing Is a Sensitive Tool for Differential Diagnosis of Myelodysplastic Syndromes in Bone Marrow Trephines. *J Mol Diagnostics*, 2018;20:344–54. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2018.01.006
34. Ganguly BB, Kadam NN. Mutations of myelodysplastic syndromes (MDS): An update. *Mutat Res Mutat Res*, 2016;769:47–62. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.04.009

35. Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, Jankowska AM, Abu Kar S, Jerez A, et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood*, 2012;119:3203–10. DOI: 10.1182/blood-2011-12-399774
36. Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Jädersten M, Jansson M, et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*, 2015;126:233–41. DOI: 10.1182/blood-2015-03-633537
37. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulton J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic SF3B1 Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts. *N Engl J Med*, 2011;365:1384–95. DOI: 10.1056/NEJMoa1103283
38. Malcovati L, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Elena C, Gallì A, Della Porta MG, et al. Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. *Blood*, 2014;124:1513–21. DOI: 10.1182/blood-2014-03-560227
39. Thol F, Kade S, Schlarman C, Löffeld P, Morgan M, Krauter J, et al. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2012;119:3578–84. DOI: 10.1182/blood-2011-12-399337
40. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*, 2011;364:2496–506. DOI: 10.1056/NEJMoa1013343
41. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, Mansat-De Mas V, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia*, 2011;25:1147–52. DOI: 10.1038/leu.2011.71
42. Damm F, Chesnais V, Nagata Y, Yoshida K, Scourzic L, Okuno Y, et al. BCOR and BCORL1 mutations in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Blood*, 2013;122:3169–77. DOI: 10.1182/blood-2012-11-469619
43. Abuhadra N, Al-Issa K, Mukherjee S, Hirsch CM, Gerds AT, Jha BK, et al. BCOR Mutations in Myelodysplastic Syndromes (MDS): Mutation Characteristics Impact Clinical Outcomes. *Blood*, 2017;130:5304. DOI: 10.1182/blood.V130.Suppl_1.5304.5304
44. Boulton J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz MJ, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2010;24:1062–5. DOI: 10.1038/leu.2010.20

45. Kohlmann A, Grossmann V, Klein H-U, Schindela S, Weiss T, Kazak B, et al. Next-Generation Sequencing Technology Reveals a Characteristic Pattern of Molecular Mutations in 72.8% of Chronic Myelomonocytic Leukemia by Detecting Frequent Alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *J Clin Oncol*, 2010;28:3858–65. DOI: 10.1200/JCO.2009.27.1361
46. McKerrell T, Park N, Moreno T, Grove CS, Ponstingl H, Stephens J, et al. Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell Rep*, 2015;10:1239–45. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.02.005
47. Della Porta MG, Galli A, Bacigalupo A, Zibellini S, Bernardi M, Rizzo E, et al. Clinical Effects of Driver Somatic Mutations on the Outcomes of Patients With Myelodysplastic Syndromes Treated With Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol*, 2016;34:3627–37. DOI: 10.1200/JCO.2016.67.3616